

東海大學化學工程與材料工程研究所

碩士論文

Master Thesis

指導教授：顏宏偉 博士

Advisor : Hong-Wei Yen, Ph.D.

參雜奈米碳管於polyether block amide複合薄膜應用於滲透蒸發系統

以提高*Clostridium acetobutylicum*丁醇發酵產量

Use of the composite membrane of polyether block amide and carbon

nanotubes in pervaporation to enhance the production of butanol by

Clostridium acetobutylicum

研究生：陳志恆 撰

Graduate student : Zhi-Heng Chen

中華民國 一零一年 六月

June, 2012

碩士學位論文指導教授推薦書

化學工程與材料工程研究所 陳志恆 君所提供之論文

參雜奈米碳管於 polyether block amide 之複合薄膜應用於滲透蒸發系統以提高

Clostridium acetobutylicum 丁醇發酵產量

係由本人指導撰述，同意提付審查

此致

化學工程與材料工程研究所所長

指導教授：陳志恆

日期：101年 6 月 15 日

碩士學位論文口試委員會審定書

化學工程與材料工程研究所 陳志恆 君所提供之論文

參雜奈米碳管於 polyether block amide 之複合薄膜應用於滲透蒸發系統以提高

Clostridium acetobutylicum 丁醇發酵產量

經本委員會審定通過，特此證明。

論文口試委員會

委員：

陳志恆
劉永全

楊昇財

指導教授：陳志恆

中華民國 101 年 6 月 15 日

謝 誌

延續大學後的研究所在這之中，讓我得以更加充實自我、拓展視野，感謝我的指導老師顏宏偉教授，在這兩年悉心的指導、關懷，在我遇到困難挫折時，給予支持和栽培，以及楊怡寬教授的教導並且給予我不同的觀念和視野。同時也感謝口試委員楊芳鏘教授、劉永銓教授對本論文細心審閱，並給予寶貴建議，使得本論文更為完美，謹此獻上最誠摯的感謝。

這個過程中，感謝實驗室學長姐德威、凱平、嘉麟、于萱、瑞真、證雄、尚甫、智勇、雅婷、方瑋、皓緯和學長姐們，在實驗及報告中的指導。同學欣培、偉誠、嘉豪、(曰俞)軒、依嬛，在這過程中互相勉勵。學弟妹儷娟、義成、金杉、榕維、芳慈、岳廷、雅鈞、懿嫻、詠琳、容慈、軒萍及學弟妹們，帶來歡樂和笑容。高分子材料實驗室佳學、慧雅、佳容、鵬仁、郁雅、鎮宇、憲麒、思羽，不厭其煩的教學。以及其他曾經幫助過我的大家。感謝我親愛的父母親以及家人，在我這段研究所求學過程中對我的鼓舞與包容，使得我有今日的成果。將此謝誌獻給曾經給予支持、幫助的你們。

摘 要

利用 *Clostridium acetobutylicum* 發酵產生丙酮(Acetone)、丁醇(Butanol)、乙醇(Ethanol) (ABE)，此發酵製程的歷史悠久，但生產技術和轉化率遠比不上現代石化工業產量，使得生物發酵製程逐漸沒落，近年來能源危機問題再度的讓生物發酵製程受到重視。生物發酵製程生產丁醇主要的瓶頸在於丁醇毒性的抑制導致生產效率下降，最終丁醇濃度偏低；進而失去商業競爭性。

因此本實驗結合滲透蒸發程序與ABE發酵製程，同步移除發酵槽內丁醇與其他代謝產物，使產物丁醇和發酵液分離、進而純化，以得到高濃度的丁醇，並提升整體的生產速率。本研究中滲透蒸發系統所採用的薄膜為聚醚-聚醯胺嵌段共聚物PEBA 2533 (Polyether block amide) + 奈米碳管CNTs(Carbon nanotubes)。

實驗探討不同比例的CNTs添加量(PEBA、PEBA+5% CNT、PEBA+10% CNT)製作薄膜並去找尋最佳選擇比，做為連續式發酵中滲透蒸發的薄膜材料。在模擬溶液中丁醇移除通量分別為9.975、16.095、15.875 (g/m²/h)，丁醇之選擇比參數(selectivity)方面為17.4、19.4、18，添加CNTs使得丁醇的通量和選擇比都會明顯上升，由於薄膜強度也會隨著CNTs的增加而提高，在連續式發酵中應用PEBA和PEBA+10% CNT薄膜，丁醇生產速率(productivity)分別為0.270、0.339 (g/L/h)，單位葡萄糖之丁醇轉化率(yield)為0.169、0.203 (g/g)。實驗結果證實CNT的添加，可以維持發酵中丁醇濃度低於毒性抑制的範圍中，進而提升整體的丁醇發酵產率。

關鍵字：ABE發酵、*Clostridium acetobutylicum*、丁醇、奈米碳管、滲透蒸發、

聚醚-聚醯胺嵌段共聚物

Abstract

Clostridium acetobutylicum produce acetone and butanol, ethanol, (ABE) by fermentation. This fermentation process has a long history, but the production technology and the conversion rate are far smaller than the modern petrochemical industry production. The fermentation process is gradually disappearing, and the energy crisis in recent years the problems of fermentation process to be taken seriously. The main bottleneck of the fermentation process is butanol toxicity of inhibition lead to the decline in production efficiency. The final butanol concentration is low, and thus loss of business competition.

In this study, it combined with pervaporation and ABE fermentation process. It can remove the fermentation tank butanol and other metabolites in the same time, so it could separate butanol and fermentation liquid then purify to high concentrations. Then enhance the overall production rate. In this experiment, pervaporation system using membrane for the polyether block amide with Carbon nanotubes.

Experimental Investigation of CNTs added in different proportions (PEBA, PEBA +5% CNT, PEBA +10% CNT) Production of the membrane and to find the best choice, as the continuous fermentation pervaporation membrane materials.

Butanol to remove flux in the model solution were 9.975, 16.095, 15.875 (g/m²/h) and butanol selection of parameters (selectivity) were 17.4, 19.4, 18. Add CNTs

makes butanol flux and choices will be obvious increase. The membrane strength and CNTs addition are positive correlation. the application of PEBA and PEBA +10% of CNT membrane in a continuous fermentation, butanol productivity, respectively, for the 0.270, 0.339 (g/L/h). Yield for the 0.169, 0.203 (g/g). The experimental results confirmed that the addition of the CNT could maintain the fermentation of butanol concentration lower than the range of toxicity suppression. Therefore enhance the overall yield of butanol fermentation.

Keywords: ABE fermentation, Butanol, *Clostridium acetobutylicum*, CNTs, PEBA, Pervaporation

目 錄

謝 誌.....	I
摘 要.....	II
Abstract.....	IV
目 錄.....	VI
圖目錄.....	IX
表目錄.....	XI
第一章 緒論.....	1
第二章 文獻回顧.....	3
2-1 生質能源.....	3
2-2 生物丁醇.....	4
2-5 菌種介紹 <i>Clostridium acetobutylicum</i>	9
2-6 固定化介紹.....	10
2-6.1 固定化方法.....	11
2-6.2 載體材料選擇.....	12
2-6.3 固定化發酵生產丁醇.....	14
2-7 滲透蒸發簡介.....	15
2-7.1 滲透蒸發原理.....	17
2-7.2 分離系統之能源消耗.....	19
2-8 滲透蒸發薄膜.....	20
2-8.1 聚醚-聚醯胺嵌段共聚物(PEBA).....	20
2-8.2 奈米碳管(Carbon nanotube, CNT).....	21
2-9 滲透蒸發膜應用於丁醇發酵.....	23
2-10 增加丁醇發酵產量的策略.....	25
第三章 材料與方法.....	29
3.1 實驗材料.....	29

3-1.1	實驗菌株.....	29
3-1.2	實驗藥品.....	29
3-1.3	實驗儀器.....	30
3-2	分析方法.....	32
3-2.1	菌體濃度測量方法.....	32
3-2.2	葡萄糖濃度測量方法.....	32
3-2.3	代謝產物 (acetone, ethanol, butanol, acetate, butyrate) 濃度測量方法.....	33
3-3	實驗方法.....	34
3-3.1	菌種保存.....	34
3-3.2	菌種活化.....	34
3-3.3	種菌培養基.....	34
3-3.4	發酵培養基.....	35
3-3.5	接菌.....	36
3-3.6	PEBA 薄膜的製備.....	37
3-3.7	PEBA/CNTs 複合膜的製備.....	37
3-4	實驗架構.....	39
3-5	實驗步驟.....	40
3-5.1	奈米碳管在 PEBA 中的分布情形之探討.....	40
3-5.2	以去離子水分別對 PEBA、PEBA+5% CNTs、PEBA+10% CNTs 薄膜接觸角的探討.....	40
3-5.3	以模擬溶液分別對 PEBA、PEBA+5% CNTs、PEBA+10% CNTs 薄膜探討.....	40
3-5.4	以 PEBA+10% CNTs 作為滲透蒸發之薄膜對發酵槽中丁醇移除.....	41
3-5.5	5-L 攪拌式發酵槽菌種固定化並連續式饋料以 PEBA、PEBA+10% CNTs 薄膜用於滲透蒸發移除丁醇.....	41
第四章	結果與討論.....	44
4-1	奈米碳管在 PEBA 中的分布情形之探討.....	44

4-2 以去離子水分別對 PEBA、PEBA+5% CNTs、PEBA+10% CNTs 薄膜接觸角度的探討.....	47
4-3 以模擬溶液分別對 PEBA、PEBA+5% CNTs、PEBA+10% CNTs 薄膜探討	50
4-4 以 PEBA 作為滲透蒸發之薄膜對發酵槽中丁醇移除.....	52
4-5 以 PEBA+10% CNTs 作為滲透蒸發之薄膜對發酵槽中丁醇移除.....	54
4-6 5-L 攪拌式發酵槽菌種固定化並批次式饋料以 PEBA+10% CNTs 薄膜用於滲透蒸發移除丁醇.....	57
第五章 結論與未來展望.....	60
5-1 結論.....	60
5-2 未來方向.....	61
附 錄.....	70
附錄 1: 菌體乾重 (biomass) 檢量線.....	70
附錄 2: 丙酮 (acetone) 檢量線.....	71
附錄 3: 乙醇 (ethanol) 檢量線.....	72
附錄 4: 丁醇 (butanol) 檢量線.....	73
附錄 5: 乙酸 (acetic acid) 檢量線.....	74
附錄 6: 丁酸 (butyric acid) 檢量線.....	75

圖目錄

圖 2-1	Butanol 結構式	4
圖 2-2	Metabolic pathways in <i>C. acetobutylicum</i>	8
圖 2-3	固定化方法 (a) adsorption ; (b) covalent binding ; (c) ionic binding ; (d) entrapment ; (e) cross-linking ; (f) encapsulation ; (g) membrane confinement	12
圖 2-4	滲透蒸發示意圖	15
圖 2-5	不同分離技術對丁醇回收所耗的能量	19
圖 2-6	聚醚-聚醯胺嵌段共聚物結構式	21
圖 2-7	(a) 奈米碳管結構 (b) 單壁奈米碳管 (c) 多壁奈米碳管	22
圖 3-1	PEBA+10CNTs 薄膜	38
圖 3-2	滲透蒸發膜組示意圖	42
圖 3-3	滲透蒸發管路示意圖	43
圖 4-1	PEBA+10% CNT 表面×5000	45
圖 4-2	PEBA+10% CNT 表面×20000	45
圖 4-3	PEBA+10% CNT 側面×20000	46
圖 4-4	PEBA+10% CNT 側面×60000	46
圖 4-5	PEBA contact angle	48
圖 4-6	PEBA+5% CNTs contact angle	48

圖 4-7	PEBA+10%CNTs contact angle	49
圖 4-8	模擬溶液槽內之丁醇濃度變化.....	51
圖 4-9	應用 PEBA 薄膜操作滲透蒸發結合連續式饋料之 ABE 生產情形.....	53
圖 4-10	應用 PEBA+10%CNT 薄膜操作滲透蒸發結合連續式饋料之 ABE 生產情形.....	55
圖 4-11	不同薄膜的滲透端丁醇濃度.....	56
圖 4-12	應用 PEBA+10%CNT 薄膜操作滲透蒸發結合固定化批次饋料之 ABE 生產情形.....	58

表目錄

表 2-1	液態燃料之特性.....	5
表 2-2	丁醇 (butanol) 之應用.....	5
表 2-3	Clostridium 生產 ABE 之碳源利用情形.....	9
表 2-4	選擇固定化載體及方法時需考量的基本要件.....	13
表 2-5	不同固定化方法常用的載體材料.....	14
表 2-6	ABE 發酵結合滲透蒸發之效能比較.....	27
表 3-1	實驗藥品清單.....	29
表 3-2	實驗儀器清單.....	30
表 3-3	種菌培養基 (seed medium, SM)	34
表 3-4	發酵培養基 (fermentation medium, FM)	35
表 3-5	Mineral salt solution 組成.....	36
表 4-1	薄膜接觸角度.....	47
表 4-2	不同薄膜的丙酮、乙醇、丁醇、乙酸、丁酸通量.....	51
表 4-3	不同薄膜的總通量、丁醇選擇比、滲透蒸發分離指數.....	51
表 4-4	以不同薄膜操作滲透蒸發結合發酵槽.....	59

第一章 緒論

近年來石油的消耗和各式各樣的環境問題如溫室效應、全球暖化、氣候變遷。這都是當前必須要改善的問題，隨著石油貯存量持續下降，價格隨之攀升，進而開始重視可再生的生質能源。

acetone-butanol-ethanol (ABE) 連續式發酵以生物作為原料，採用生物發酵法生產各種化工產品及液體燃料受到了廣泛關注。相較傳統的批次發酵需要龐大的體積且不利於商業化量產以及高濃度丁醇對於 *Clostridium acetobutylicum* 毒性抑制所造成的低濃度丁醇發酵。

在生物發酵製程中不斷移除產物丁醇，減少抑制效應並提高產率，很多方法已被應用於從發酵液中移除丁醇，包括gas stripping、pervaporation、liquid-liquid extraction、adsorption、perstraction等，其中以滲透蒸發被認為是最佳的方法，滲透蒸發對微生物不會引起任何有害影響且低耗能。PEBA薄膜對丁醇有良好的選擇性，而CNTs具有疏水性質可增加PEBA對丁醇的選擇性，且CNTs有高機械強度。本研究中滲透蒸發系統所採用的薄膜為聚醚-聚醯胺嵌段共聚物PEBA 2533 (Polyether block amide) + 奈米碳管CNTs(Carbon nanotubes)。

ABE 發酵時會對最終產物抑制導致丁醇的低產率，過去幾十年來工程師們企圖改善發酵程序來增加產率，包含滲透蒸發、細胞固定化、細胞回收再利用等。來降低最後產物的抑制效應。由於以上諸多的問題所以本實驗利用滲透蒸發程序結合 ABE 發酵製程，同步移除發酵槽內丁醇與其他代謝產物，使產物丁醇和發

醇液分離、進而純化，以得到高濃度的丁醇，並提升整體的生產速率。

第二章 文獻回顧

2-1 生質能源

生質能源主要是指以生物質量以固、液、氣態的形式去產生能量；固態為廢棄物衍生物燃料(RDF)等，液態為生質乙醇、生質丁醇、生質柴油等，氣態為生質氣、沼氣(甲烷)等。生質能源為一種再生能源，其優勢在於所使用的原料為可永續生產的資源。此外，生質能源還具有多項優點，如提供低硫燃料，可降低空氣污染；使用廢棄物、家畜糞便生產能量，可減輕廢棄物處理的負擔，減少環境公害；利用農村附近的生物資源來製造燃料，既可減少原料的運輸費用，殘渣又可充當農田肥料；工業廢料與城市垃圾轉換成熱能或電力，可維護環境品質，同時減少堆置掩埋所需的土地；與原有的礦物燃料相比更具有高燃點、高含氧、潤滑性佳與燃燒性能佳之特質；生物可降解性亦對土壤及水的污染傷害低（周，2009）。由此可見，生質能源對於環境保護和能源替代的效益極佳，為目前能源開發中最具潛力之焦點。

2-2 生物丁醇

丁醇為四個碳原子所組成的醇類，可分為下列四個化合物，正丁醇(n-butanol)、異丁醇(iso-butanol)、仲丁醇(sec-butanol)、叔丁醇(tert-butanol)，微生物發酵所生產的丁醇為正丁醇(以下簡稱 butanol)，butanol 為澄清液體，具有臭味，可溶於醇、醚類及其他有機溶劑中，且微溶於水，為精細化工中的原料；分子式 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ，分子量 74.12 g/mol，在 1 atm 下沸點 117.73 °C、閃點 37 °C，在 25 °C 下的溶解度 9.1ml/100ml H_2O ，分子結構如(圖 2-1)所示。

做為生質燃料方面，由於丁醇與汽油的混合比高，故無需對車輛進行改造，就可使用濃度幾乎 100% 的丁醇；且與同屬醇類燃料的乙醇 (ethanol) 相比，其優越的性質，如能源含量高、揮發性低、對水的溶解度與吸收度低。使丁醇被歸為優於乙醇的替代能源(表 2-1) (Durre, 2007)。

丁醇為重要的有機化學原料，主要用途為做植物油、生物鹼、有機染料和印刷油墨之溶劑，它可以溶解油類、樹脂、蠟質等，也用於生產鄰苯二甲酸二丁酯 (Dibutyl phthalate, DBP)、鄰苯二甲酸苯基丁酯 (Phenyl-butyl phthalate, BBP) 等增塑劑及醋酸丁酯、丙烯酸丁酯等化學品；除了在塗料、製藥、化妝品、有機合成和塑膠工業等方面有著廣泛的應用外，丁醇亦可做為醫療上殺菌，現今更被視為熱門的生質燃料(表 2-2)。

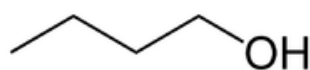


圖 2-1 Butanol 結構式

表 2-1 液態燃料之特性(Ramey, 2007)

Characteristic	Ethanol	Butanol	Gasoline
Formula	C ₂ H ₅ OH	C ₄ H ₉ OH	C ₄ -C ₁₂
Energy content(BTUs/gallon)	84 k	110 k	115 k
Air/fuel ratio	9	11-12	12-15
Additive ratio (%)	85	100	—
Vapor pressure(psi@100°F)	2	0.33	4.5
Solubility(ml/100ml H ₂ O)	infinite	9.1	Insoluble
Corrosive	higher	lower	—

表 2-2 丁醇 (butanol) 之應用

Applications	Used/Methods
solvents	for paints, varnishes, resins, gums dyes, camphor, fats, waxes, rubbers and alkaloids
plasticizers	to improve how a plastic material processes
coatings	as a solvent for a variety of applications, such as curable lacquers and cross-linked baking finishes
chemosynthesis	for producing many other chemicals and plastics, including safety glass, hydraulic fluids and detergent formulations
textiles	as a swelling agent and manufacturing garments from coated fabric
cosmetics	for eye makeup, foundations, lipsticks, nail care products, personal hygiene products and shaving product
medicines	drugs and antibiotics, hormones, and vitamins
fuels	gasoline(as an additive)and brake fluid(formulation component)
others	flotation agents, cleaners, and floor polishes

出處：The Dow Chemical Company. Product Safety Assessment (PSA): n-Butanol

2-3 微生物發酵法

微生物發酵生產丁醇，最早在 1861 年由 Pasteur 所發表，後來一些學者陸續研究以厭氧菌生產丁醇，在 1912 和 1914 年間，Weizmann 於研究合成橡膠的過程中，發現丁醇或異戊醇是重要的化學合成中間物，並於 1914 年，提出利用 *C. acetobutylicum* 菌株來進行 ABE (acetone-butanol-ethanol) 發酵法。二次世界大戰後 ABE 發酵漸漸沒落，1960 年代，由於石化合成技術的迅速發展，且發酵法生產所需的原料成本高、程序複雜和產物不易回收等因素，導致微生物發酵法逐漸被較具經濟效應的化學合成法取代，微生物發酵法生產丁醇的研究漸漸不受重視而停滯，僅剩南非、蘇聯等國因受到國際禁運而缺乏石油，仍持續維持進行發酵製程。1973 年能源危機發生，隨著石油資源日益緊缺造成原油價格竄升，各地開始紛紛投入利用可再生資源來取代石油原料的研究，以微生物發酵丁醇 (ABE) 之研究再次興起 (Jones and Woods, 1986)。

ABE 發酵主要的經濟因素為原料成本問題，透過微生物發酵程序來生產丁醇的發酵製程又稱為 ABE 發酵，在於其代謝產物包含丙酮(Acetone)、丁醇 (Butanol)以及乙醇(Ethanol)。以厭氧菌 *Clostridium* 作為菌種生產時，其 ABE 的產量比例約為 3:6:1。丁醇代謝路徑如圖 2-2 所示，主要依其生成之產物不同而分為兩階段。首先，於發酵前期 *C. acetobutylicum* 利用 glucose 經由 glycolysis 路徑產生 pyruvate，再經由 pyruvate 生成大量的有機酸包括 acetate, butyrate, lactate 等。稱為第一階段酸生產期(acidogenic phase)產酸過程同時會釋放出 CO₂ 和 H₂，

由於大量的酸性物生成進而導致此階段的發酵液 pH 值有迅速下降之趨勢。

第二階段溶劑生產期(solventogenic phase)的開始涉及碳代謝由產酸途徑向產溶劑途徑的轉變，這種轉變機制目前尚未研究透徹。早期的研究認為，這種轉變和pH值的降低以及酸的積累是密不可分的。在產酸期產生大量的有機酸，不利於細胞生長，所以產溶劑期的酸利用被認為是一種減毒作用。但是pH值的降低以及酸的積累並不是產酸期轉向溶劑生產期的必要條件。當有機酸的含量超過一定值，尤其是在butyric acid的濃度大於2 g/L且pH值下降至低於5時，便開始正式進入發酵後期的溶劑生產期 (solventogenic stage)，此時期的主要代謝路徑是先藉由acetoacetyl-CoA轉變成acetone之反應途徑，促使前發酵產物 acetic acid 、butyric acid還原成acetyl-CoA及butyryl-CoA並經由acetoacetate decarboxylase產出丙酮，acetyl-CoA經由acetaldehyde dehydrogenase和alcohol dehydrogenase(ADH)得到乙醇，同步進一步利用butyraldehyde dehydrogenase (BYDH)和butanol dehydrogenase (BDH)之催化，讓中間產物butyryl-CoA還原成主產物—丁醇。(Ezeji, 2007)

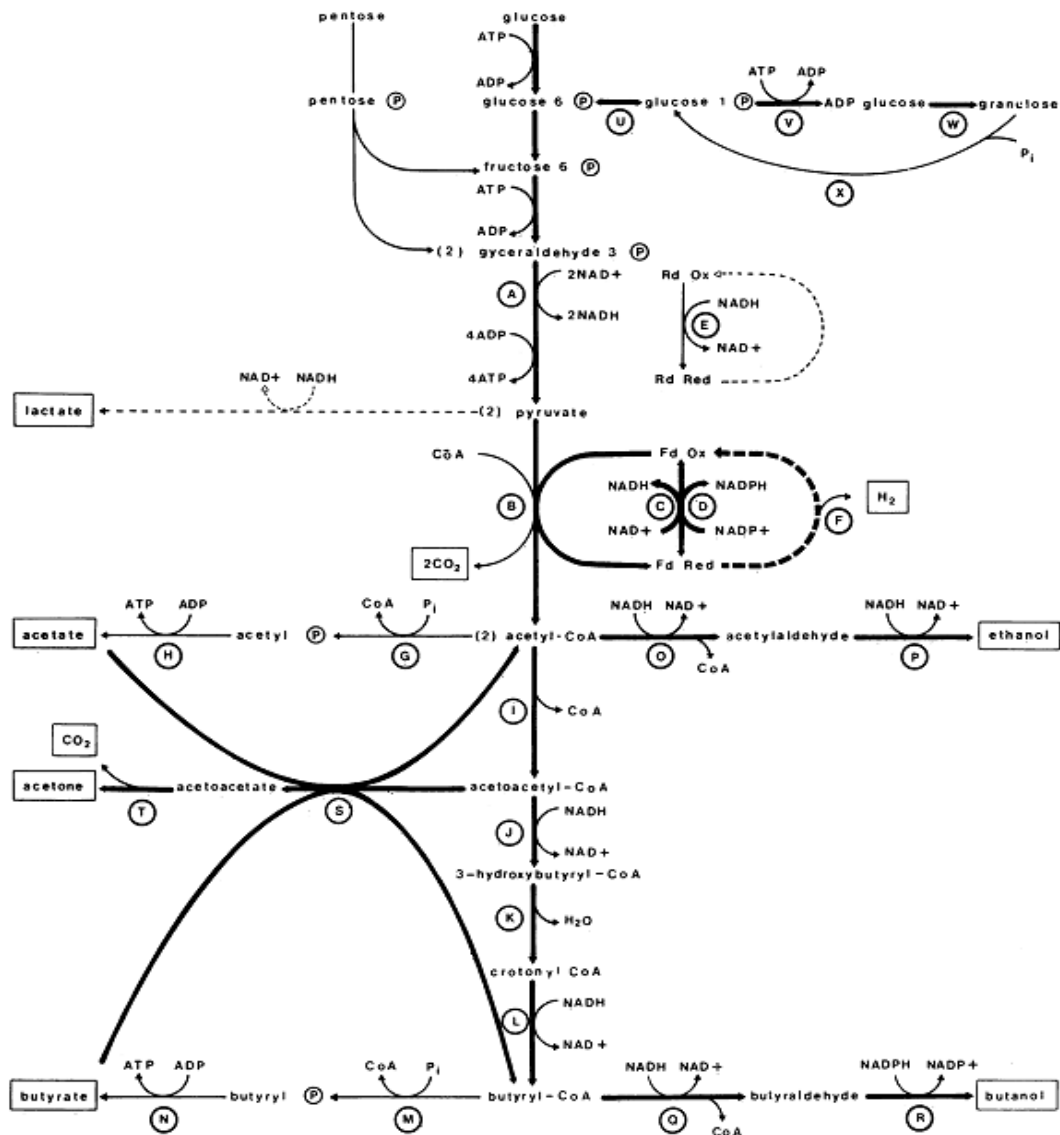


圖 2-2 Metabolic pathways in *C. acetobutylicum*.(Jones and Woods, 1986)

Enzymes are indicated by letters as follows: (A) glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; (B) pyruvate-ferredoxin oxidoreductase; (C) NADH-ferredoxin oxidoreductase; (D) NADPH-ferredoxin oxidoreductase; (E) NADH rubredoxin oxidoreductase; (F) hydrogenase; (G) phosphate acetyltransferase (phosphotransacetylase); (H) acetate kinase; (i) thiolase (acetyl-CoA acetyltransferase); (J) 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase; (K) crotonase; (L) butyryl-CoA dehydrogenase; (M) phosphatebutyryltransferase (phosphotransbutyrylase); (N) butyrate kinase; (O) acetaldehyde dehydrogenase; (P) ethanol dehydrogenase; (Q) butyraldehyde dehydrogenase; (R) butanol dehydrogenase; (S) acetoacetyl-CoA:acetate/butyrate:CoA transferase; (T) acetoacetate decarboxylase; (U) phosphoglucosmutase; (V) ADP-glucose pyrophosphorylase; (W) granulose (glycogen) synthase; (X) granulose phosphorylase.

2-4 菌種對碳源選擇

丁醇發酵程序之菌種主要為 *Clostridium* 屬的厭氧菌。而依照其對碳源的喜好程度不同大致可分為兩大類：一種是發酵澱粉類，常見的如 *C. acetobutylicum* ATCC 824 和 *C. acetobutylicum* DSM 1731；另一種是發酵糖蜜類，如 *C. beijerinckii*、*C. acetobutylicum* NCIMB 8052 和 *C. saccharoperbutylacetom* N 1-4 (Ezeji et al., 2008)。

表 2-3 *Clostridium* 生產 ABE 之碳源利用情形(Ezeji et al., 2008)

Organisms	Sugar preference*
<i>C. acetobutylicum</i> 260	Glucose > cellobiose > mannose > arabinose > galactose > xylose
<i>C. acetobutylicum</i> 824	Glucose > arabinose > xylose > cellobiose > galactose > mannose
<i>C. saccharobutylicum</i> 262	Glucose > arabinose > galactose > cellobiose > xylose > mannose
<i>C. butylicum</i> NRRL 592	Glucose > cellobiose > mannose > arabinose > galactose > xylose
<i>C. beijerinckii</i> BA101	Cellobiose > glucose > xylose > arabinose > mannose > galactose

*依最大的 ABE 產量而定

2-5 菌種介紹 *Clostridium acetobutylicum*

C. acetobutylicum 為革蘭氏陽性菌 (Gram-positive)，於 1974 年被 Smith 和 Hobbs 所提出，因此菌株可產生 acetone 和 butyl alcohol 而命名之。外觀上呈直桿狀且具移動性，細胞周圍有鞭毛，屬於典型的絕對厭氧菌。一般存在於土壤、人和牛的排泄物、汗水、湖裡的沉積物和蛤的內臟，適合生長的溫度為 15-69°C，而在 pH 值為 6.5-7 及溫度 30-37°C 的環境中生長較快。

由於能將多種碳氫化合物經發酵轉成 acetone-butanol-ethanol (ABE) 和 H_2 、 CO_2 而獲得學者們巨大的興趣，但也因產物丁醇 (butanol) 達 12-16 g/l 時會對 *Clostridium* 產生毒化作用，使得研究陷入一定的瓶頸中。而現今已發展至可透過 adsorption、gas stripping、liquid-liquid extraction、reverse osmosis、perstraction 和 pervaporation 等方式，移除培養基中的丁醇以達成高產量之目標 (Qureshi et al., 1995)

2-6 固定化介紹

固定化微生物技術是利用化學或物理程序將懸浮微生物封閉或限制於某一特定的空間區域內，使微生物在反覆連續操作的條件下仍能保持活性，維持較高的細胞濃度及加快生產速度，即藉由人工的方式將懸浮微生物固定或限制在固態載體 (carriers) 中，使微生物由隨機移動狀態轉變成固定狀態。相較於懸浮微生物的反應系統，由於有載體的保護，固定化微生物較不易受外界環境的影響，且固定化微生物可以重複使用，延長微生物的使用時間以及維持操作系統的穩定性 (吳, 2006)。因此，固定化微生物具有微生物密度高、反應速度快、抗污能力強、微生物流失少、產物容易分離和處理設備小等優點。

2-6.1 固定化方法

固定化方法會影響生物的活性，因此在微生物做固定化必須考慮可利用性、再利用性及穩定性。因此在固定化方法跟固定載體選擇成為必須考慮的因素。依照固定化的方法大致上可分為四大種類：(a) 附著或吸附於固定載體表面，例如吸附法(adsorption)、共價鍵結法(covalent binding)與離子鍵結法(ionic binding)；(b) 包埋於多孔隙的載體中，例如包埋法(entrapment)；(c) 以自然或人工誘導方式使微生物絮凝，例如交聯法(cross-linking)；(d) 利用機械方式限制微生物活動空間，例如包覆法(encapsulation)與膜限制法(membrane confinement)(Pilkington et al., 1998)。

吸附法(圖 2-3a)是利用微生物與載體表面之間的物理作用力，如凡得瓦爾(van der Waals)力、靜電力和疏水性作用力，使微生物附著在載體上。由於利用微生物與載體間的表面作用力使微生物附著於載體上，不需要額外的化學活化，故相較於其他固定化方法具有操作簡單、固定化條件溫和、細胞活性損失小與載體可以反覆使用等優點；但也由於微生物與載體間表面作用力都非常微弱，因此 pH 值、溫度、離子強度、基質濃度的改變與進料流動速率、攪拌、顆粒之間的磨損都會導致脫附發生，造成微生物的損失，也增加回收產品的難度(吳, 2006)。

吸附法即為本實驗中菌體固定化之方法。

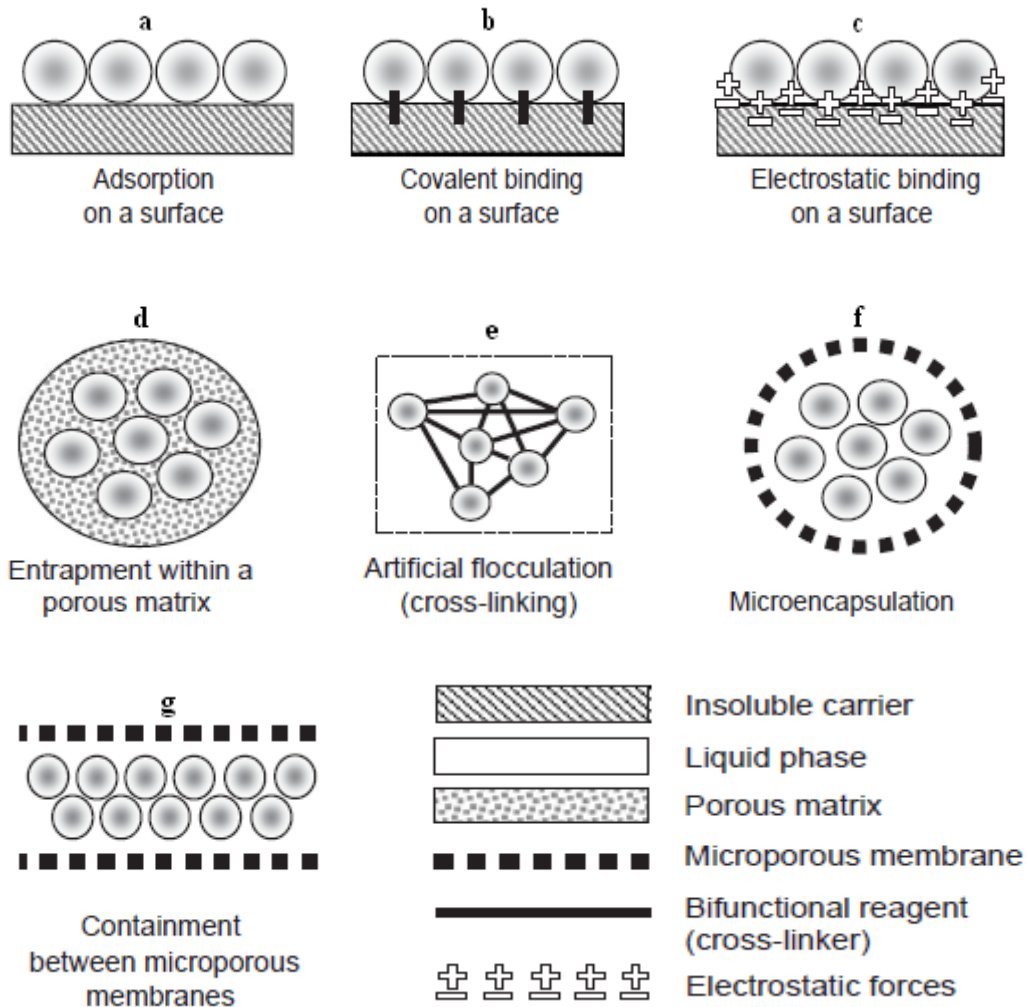


圖 2-3 固定化方法 (a) adsorption ; (b) covalent binding ; (c) ionic binding ; (d) entrapment ; (e) cross-linking ; (f) encapsulation ; (g) membrane confinement

2-6.2 載體材料選擇

載體材料是影響微生物固定化發酵之重要的因素，理想的固定化載體應不影響微生物活性、質傳性能良好、化學與物理性質穩定、機械强度高，且在人體安全與環境永續的考量下，載體本身需具備無毒性、生物相容性(biocompatibility)、生物可降解性 (biodegradability)、載體再生 (regenerate) 容易、壽命長與價格低廉等 (表 2-4)。

表 2-4 選擇固定化載體及方法時需考量的基本要件 (吳, 2006)

特性	考慮因素
物性、化性	強度，非壓縮顆粒，有效表面區域，形狀（顆粒、薄膜、纖維狀），孔洞程度，顆粒體積，滲透性，密度，微生物生長空間，流動速率。親水性（載體與水的鍵結），對微生物不具反應性，載體的再生性及重複使用。
穩定性	微生物產率，微生物活性再生與維持，載體穩定性。
抗性	外來菌體的侵害，化學藥劑分解，pH 值，溫度，有機溶劑，微生物防禦機制（蛋白質）。
安全性	生物相容性（免疫反應），添加反應劑之毒性，製備過程及最終產物對人體健康和安全的影響，應用於食品、醫藥及醫學上需特殊之固定化製備。
經濟效益	載體的取得及成本，化學藥劑，特殊設備，技術需求，環境衝擊，工廠規模，放大製程的可行性，連續製程，載體的重複使用性，CRL*或 zero 污染。
反應	流動速率，微生物負荷量及生產率，反應動力學，子反應，多微生物系統，批次、CSTR、PBR、FBR、ALR**等，基質與產物質傳限制。

*CRL：推測所承受風險程度 (calculated risk level)；**CSTR：連續攪拌槽反應器 (continuous stirred tank reactor)、PBR：填充床反應器 (packed bed reactor)、FBR：流體化床反應器 (fluidized bed reactor)、ALR：氣舉式反應器 (air lift reactor)

表 2-5 不同固定化方法常用的載體材料 (吳, 2006; Kourkoutas et al., 2004)

methods	Metarials
adsorption	aluminium、propylagarose、titania-actived glass、synthetic resin、silica gel、wood、sawdust、coke、bonechar、brick
covalent binding	cellulose、dextran、starch、porous glass、porous silica、polyacrylamide、nylon-acrylate copolymer
ionic binding	polygorskite、montmorilonite、hydromica、porous porcelain
entrapment	alginates、κ-carrageenan、agar、chitosan、gelatin、collagen
cross-linking	glutaraldehyde、toluene diisocyanate、hexamethylene diisocyanate
encapsulation	glycol、polyphenols、bishalogen formiate、polystyrol

2-6.3 固定化發酵生產丁醇

固定化發酵生產丁醇常用的固定化方法為吸附法與包埋法。吸附法為一種簡易的技術，可直接於反應槽中進行吸附作用，且不需經由化學反應以達到固定化的成效，降低固定化對微生物的傷害。吸附法常用的載體皆為成本較低廉之載體。

利用固定化發酵製程，有較高的 ABE 生產速率和反應系統穩定性。平均結果顯示固定化發酵 ABE 生產速率可達 0.3-0.5 g/l/h，比傳統非固定化之生產速率 0.1-0.3 g/l/h 高。故由於吸附法的簡易技術、高 ABE 生產速率、高穩定性與低成本，使得吸附法較易被應用於放大 (scale-up) 規模中 (Qureshi et al., 2004)。

2-7 滲透蒸發簡介

pervaporation 過程是結合的滲透(permeation)及蒸發(evaporation)兩種不同分離程序。滲透蒸發過程是液體中包含兩個或兩個以上的互溶溶液放置在一邊且接觸在非多孔聚合膜或多孔無機膜並用真空或氣體將分子移到另一邊。在滲透蒸發中薄膜是介於液相與氣相間的分隔層，提供了待分離物質轉換成滲透物質的途徑；在進料端維持常壓，滲透端則抽真空，利用薄膜兩側的壓力差使溶液通過薄膜並氣化成氣體。

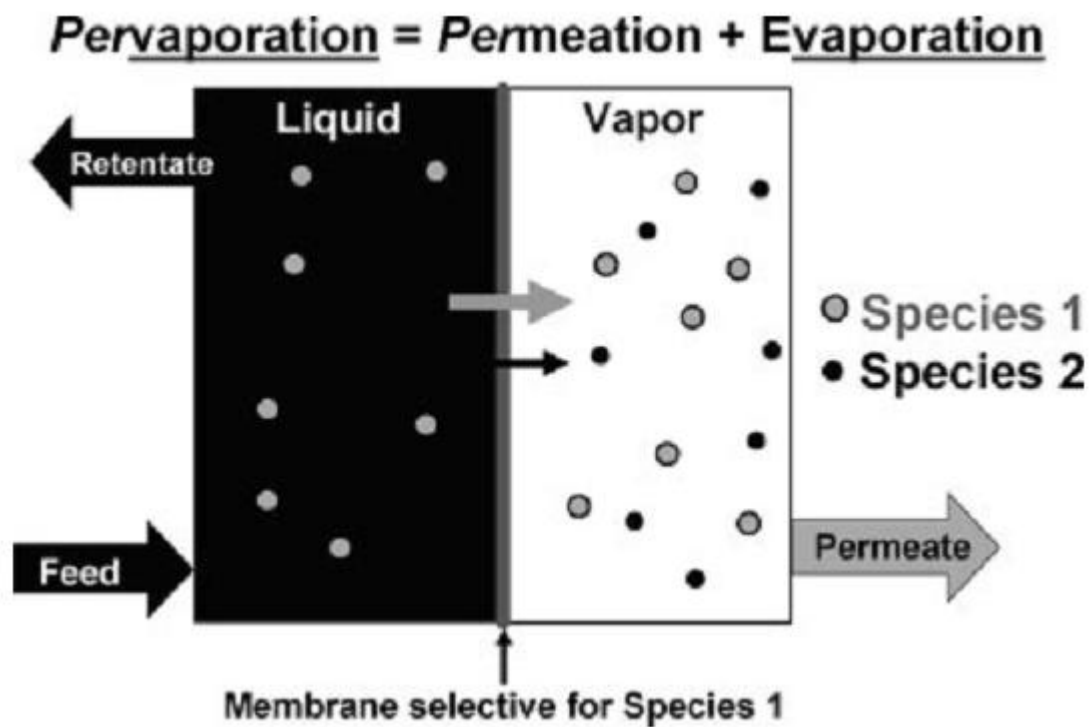


圖 2-4 滲透蒸發示意圖(Leland, 2005)

滲透蒸發概念最早由 Kober 於 1917 年提出(Kober, 1917), 接著 Farber 在 1935 年有效將滲透蒸發應用於濃縮與分離後(Farber, 1935); 1956 年, Heisler 等人以醋酸纖維膜進行乙醇脫水的實驗(Heisler, 1956)。在 Heisler 的實驗之前, 滲透蒸發的研究是零散, 並沒有引起重視。1958~1962 年期間 Binning 等人將滲透蒸發應用在石油煉製品中的碳氫混合物分離, 提升汽油之辛烷值(octane number) (Binning, 1958); 同時一些學者也對醇類/水、正庚烷/異辛烷及乙醇/丙酮等進行研究, 但這些研究仍然停留在實驗室試驗階段, 因為沒有發展出具足夠透過量及適度選擇性的膜(Sanders, 1960)。最早的商業化滲透蒸發膜由德國 GFT 公司在 1982 年首創, 隨後 GFT 公司在西歐及美國設立了二十多座大規模的工廠; 而於 1988 年在法國 Betheniville 建立了最大的滲透蒸發生產裝置, 年產四萬噸無水酒精, 至今為止, 世界上已有一百多套以上的滲透蒸發裝置。

2-7.1 滲透蒸發原理

滲透蒸發的質傳機制中，主要都引用吸收-擴散機制(sorption-diffusion mechanism) 基本理論為透過物分為下列三大步驟完成質傳機制:

第一部分為吸附：溶液在進料端與薄膜表面接觸，依照溶液和薄膜之親和性不同，導致進料溶液吸附進入薄膜的程度不同。

第二部分為擴散：進料分子依性質不同在薄膜內擴散，不同的分子以不同的速率擴散通過薄膜。

第三部分為蒸發：當物質擴散進入滲透端，因為系統維持在低壓狀態，滲透物質會快速氣化而脫附。

滲透蒸發程序主要關鍵是薄膜，因此決定薄膜時須考慮到兩個重要指標，即滲透通量和選擇性，通量(flux)越大表示薄膜在單位時間內所收集到的透過物越多，而選擇比(separation factor)越大表示單位時間內收集到的滲透物質中含欲選擇的成分越多

通量(flux)

滲透通量為單位時間、單位時間滲透過薄膜的物質量，定義如下：

$$J = \frac{W}{A \times t}$$

其中 J 為滲透通量($\text{g}/\text{m}^2 \cdot \text{h}$)； W 為通透過薄膜的滲透質量； A 為膜面積(m^2)； t 為收集時間(h)。滲透通量大小決定了完成給定分離任務所需膜面積的大小；膜的滲透通量愈大，所需膜的面積就愈小。

選擇比(separation factor)

膜的選擇性表示薄膜對不同組成分離效率的高低，通常用分離係數 α 表示，

定義如下：

$$\alpha_{ij} = \frac{Y_i/Y_j}{X_i/X_j}$$

其中 Y_i ， Y_j 分別為滲透端中成份i與j的重量分率； X_i ， X_j 分別為進料端中成份i與j的重量分率。

滲透蒸發分離指數(pervaporation separation index)

滲透通量和選擇比通常為反比關係，選擇係數高的薄膜，滲透通量一般較少。

綜合以上兩種因素的影響，Huang 和 yeom 引入了滲透蒸發分離指數(PSI)，定義

為滲透通量和選擇比乘積。(Huang et al., 1990)

$$PSI = J \times \alpha$$

上述定義的缺點就是無法正確的反映出分離係數為 1 時的情況，因為當分離係數為 1 時(表示無分離效果)，PSI 可能亦會很大，為此 Huang 和 Feng 引入經修正的滲透蒸發分離指數(PSI)，定義如下(Huang et al., 1993)

$$PSI = J \times (\alpha - 1)$$

2-7.2 分離系統之能源消耗

選擇節能的分離技術應用在丁醇回收，對於未來在工業上應用具有相當大的競爭力。因此評估對不同分離技術對丁醇回收的能源需求，這些技術包括：蒸餾 (steam stripping distillation)、氣提 (gas stripping)、吸附 (adsorption)、滲透蒸發 (pervaporation) 和液-液相萃取 (liquid-liquid extraction)。其不同分離技術對丁醇回收能耗比較 (Qureshi et al., 2005)。

在分離過程中所選用的滲透蒸發，蒸餾和氣提所耗費的能源較高，相對於本實驗所用之方法較為節能，而萃取和吸附耗能低，但由於在結合發酵時，易發生萃取劑對細胞的破壞；以及培養基中碳氮源的吸附，導致碳氮源不足。

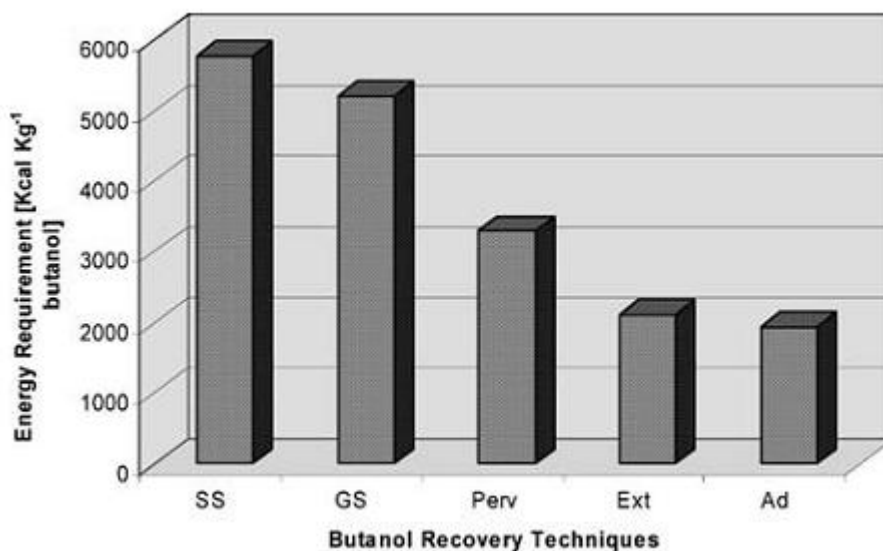


圖 2-5 不同分離技術對丁醇回收所耗的能量 (Qureshi et al., 2005)

SS —steam stripping distillation，GS —gas stripping，Perv—perva-poration，
Ext—liquid-liquid extraction，Ad —adsorption on to silicalite

2-8 滲透蒸發薄膜

2-8.1 聚醚-聚醯胺嵌段共聚物(PEBA)

嵌段共聚物(block copolymer)是指將兩種或兩種以上性質不同的聚合物鏈段連在一起製備而成的一種特殊聚合物，它可以將多種聚合物的優良性質結合在一起，得到性能比較優越的功能聚合物材料。

熱可塑性彈性體(Thermoplastic Elastomer, TPE)：通常是一種嵌段共聚物，由於嵌段共聚物的熱力不相溶性導致微觀相分離的形態。熱可塑性彈性體通常是由軟段和硬段的嵌段所組成。在使用溫度下，硬段可以作為軟段似橡膠的物理交聯。

聚醚-醯胺類的熱塑性彈性體屬於分段型嵌段共聚物，這類的嵌段共聚物是由交替的多嵌段所組成，每嵌段的分子量幾乎都小於 4000，一般可以用 $(-A-B)_n$ 表示。

本實驗研究材料聚醚-聚醯胺(PEBA)。它們的硬段是聚醯胺，軟段是聚醚，藉由調整軟段和硬段的組成，而達到理想的熱性能和機械性能。

常用當作 PEBA 硬段有尼龍 6 (PA6) 或尼龍 12 (PA12)，而軟段可由聚四亞甲基二醇(Polytetramethylene glycol, PTMG)或聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG) 組成。在本研究中使用的 PEBA 是以 PA12 和 PTMG 為硬段與軟段

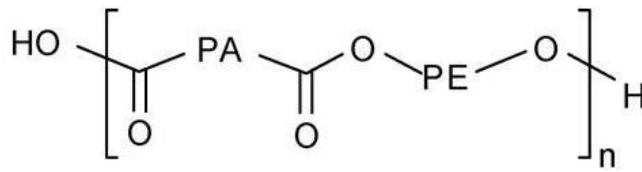


圖 2-6 聚醚-聚醯胺嵌段共聚物結構式

其中，PA 是聚醯胺嵌段(硬鏈段)，PE 是聚醚嵌段(軟鏈段)，各段的分子量通常低於 4000。隨 PEBA 中的聚醯胺段含量的不同，此共聚物從幾乎透明狀變化至白色不透明狀，當聚醯胺段的含量增加時，PEBA 的硬度、拉伸強度、抗彎模數也隨著上升。

2-8.2 奈米碳管(Carbon nanotube, CNT)

1991 年，Iijima 以高解析度穿透式電子顯微鏡觀察電弧放電後石墨陰極沉積的針狀物，顯示出這些針狀物是由 2~50 層的石墨網狀結構以同心軸捲曲成中空管狀結構，長約 1 μm ，直徑為 4~30 nm，此嶄新的碳結構稱為奈米碳管(Iijima, 1991)。奈米碳管是由碳原子以 sp^2 混成為主，奈米碳管可看成是片狀石墨烯捲成的中空管體。因此必然具有石墨極優良的本徵特性，如耐熱、耐腐蝕、高強度、生物相容性等。

奈米碳管可分為單壁奈米碳管(SWCNT)與多壁奈米碳管(MWCNT)。

MWCNT 具有很強的機械強度，其楊氏係數在 270-950 GPa 之間，拉伸強度為 11-63 GPa 之間。具有如此高的機械強度必然是複合材料首選。其複合材料之強度與單位體積的碳管含量成正相關。

合成奈米碳管的方法主要有電弧放電法(arc discharge method)、雷射蒸發法(laser ablation/vaporization)與化學氣相沉積法(chemical vapor deposition)等三種。本實驗是採用Cnano所生產的FloTube 9000(MWCNT)，FloTube 9000是經由化學氣相沉積法。平均直徑11nm，平均長度10 μ m，純度>95%，表面積230-280m²/g。奈米碳管力學性能的理论和實驗研究顯示奈米碳管具有很好的力學性能，可將其用做複合材料的增強體。由於奈米碳管長度很短，做為複合材料增強劑時不僅需要考慮奈米碳管和基體的結合情況。

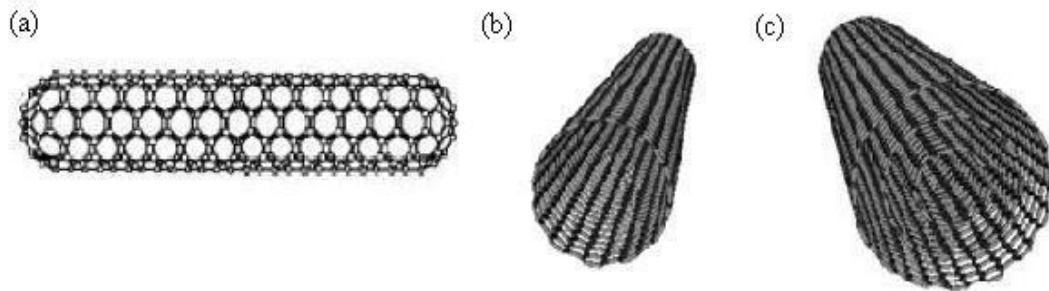


圖 2-7 (a)奈米碳管結構 (b)單壁奈米碳管 (c)多壁奈米碳管

楊氏係數(Young's modulus)為材料力學性能的基本參數之一，與固體中的原子結合力直接相關；拉伸強度(tensile strength)是材料的力學參數之一。

2-9 滲透蒸發膜應用於丁醇發酵

ABE 發酵是個歷史悠久的發酵製程，但自從 1960 年代後就不再有生物發酵丁醇的工業製程，主要原因不外乎是低濃度的丁醇產量與生產速率，以及高單價發酵基質，以及後續回收製程所帶來的低經濟競爭性。目前而言，大部分的丁醇發酵都轉向直接使用農業澱粉進行直接丁醇發酵，因此相對降低了基質的單價，且隨著全世界減碳要求，農業產品之直接發酵將會大幅的降低碳排放量，因此相當的具有相當高的競爭性。但高濃度丁醇所帶來的抑制效果，卻會降低發酵製程的生產速率。因此如何有效的降低發酵製程中丁醇濃度，將可避免丁醇對菌體的毒害效果，進而提升發酵濃度，並可有效的簡化後段回收純化的複雜度(El-Zanati et al., 2006)。

傳統上直接用於發酵槽的丁醇分離技術最主要的技術為氣體沖提(Gas stripping)以及利用滲透蒸發(Pervaporation)。氣體沖提分離方式主要是利用丁醇的高揮發性，利用氮氣(或CO₂)沖提發酵槽，將發酵液中的液態丁醇轉成氣態丁醇後，再利用冷凝器將丁醇冷凝成液態進行下一階段的回收純化，而氮氣就可以再回流回發酵槽內進行往復沖提。氣提沖提方式的最大限制就在於能量的耗損，由於大量經過冷凝器的氮氣沖提發酵，會降低發酵槽的溫度，因此持續的加熱是必要的，且為了達到冷凝丁醇的目的，熱交換所需之能量相當的大，因此高能量需求降低了氣體沖提方式工業化生產之可能性。

而另一種常使用來分離丁醇的方式即為滲透蒸發的過濾效果來進行連續式

丁醇分離。由於發酵製程中除了必須降低丁醇濃度以避免毒害效應外，還得避免發酵槽操作過程中的污染問題，因此利用滲透蒸發薄的過濾效果來分離丁醇並使得菌體回流至發酵槽內是近年來相當受到注目的技術。

在滲透蒸發（pervaporation）技術中所使用的過濾薄膜是一道經過特殊設計的多孔膜，利用介於液相與氣相間的分隔層將液態的丁醇轉換成氣態丁醇，且分離過程中不需使用高溫，只利用薄膜兩側的壓力差使液相進入薄膜內，進一步氣化成氣體而脫離原本的發酵液造成分離現象。由於不需使用高溫，因此能量耗損相對來的低，這也是滲透蒸發技術與傳統分離系統最大的差異。此外，相較於傳統的蒸餾分離系統是以氣—液平衡做為分離的基礎。滲透蒸發的選擇比是來自於待分離物質間分子大小的差異。以及對薄膜材料親和性的不同。

滲透蒸發的分離機構可分為3個步驟：混合液與薄膜表面接觸，並依照進料物種的化學活性與對薄膜親和性的不同，造成進料物質可以溶解進入膜內；藉著進料分子本身的大小、形狀，以及過濾物和膜材親和性所造成擴散速率的差異，進而擴散通過薄膜；當滲透物質擴散透過膜材後，因為整體過濾系統維持在低壓狀態下，因而滲透物質仍舊是以氣態方式呈現，經過一組冷凝器後再凝結成液態。由於丁醇發酵時，菌體發酵液相當的複雜，除了有丁醇、丙酮還有乙醇，甚至包含許多細胞碎片，胞內蛋白質等等因此滲透蒸發膜應用於實際發酵工業化分離丁醇的範例還不甚普遍，但隨著丁醇發酵的重要性日漸增高，利用滲透蒸發膜來達到有效的分離應該是未來的一個趨勢。

2-10 增加丁醇發酵產量的策略

(一) 提高丁醇濃度耐受菌種之篩選

由於丁醇對細胞的毒性，造成發酵液中丁醇的含量難以達到較高的濃度，進一步降低了終端溶劑產率。因此提高發酵菌種對丁醇的耐受性，是提高溶劑產率的先決條件。然而，由於丁醇造成細胞毒性的原因相當的複雜，且尚未有一定的推論，因此篩選耐高濃度丁醇菌種難度極高。文獻曾經指出利用降低細胞自體溶解酵素活性(lysisactivity)，可以有效增加細胞對丁醇的耐受性。利用氯黴素前處理丁醇發酵菌株，使得自溶現象降低40%，丁醇的終端濃度就可以提高了30%。另外有些作者認為，原生質體融合是一種提高菌種對丁醇耐受性的好方法，將高耐受丁醇的菌和丙丁菌進行融合，理論上可能篩選到高丁醇耐受性的高產量菌種(Montoya et al., 2000)。

(二) 高丁醇比例菌種的選育

一般ABE發酵中，產物丙酮、丁醇、乙醇的比例大約為3:6:1，而實際上需要更高比例的有更廣泛用途的丁醇。隨著基因工程及代謝工程的發展，人們可以在現有研究的基礎上進一步闡明代謝過程的限速酶，解除代謝過程中可能存在的產物或者中間產物的抑制，從而使得丙酮丁醇發酵快速高效的進行。強化丁醇生產中的關鍵酶，如acetoacetyl-CoA:acetate/butyrate:CoA transferase、丁醛脫氫酶等，強化丁醇的生成代謝，是提高丁醇比例的較好方法。另外，利用基因工程的方式

直接剔除乙醛脫氫酶基因，降低代謝通量走向乙醇生成路徑，進而減少acetyl-CoA 的消耗，也可以提高丁醇於總產出溶劑間的比例。

(三) 結合發酵製程與分離純化技術

傳統的丁醇發酵生產製程，一般使用蒸餾方式來達到產物的分離純化目的，然而這需要消耗大量的能量，造成整體生產成本提高，而且採用蒸餾純化方式並無法直接與丁醇發酵槽連結，因而無法及時的降低發酵槽內的丁醇濃度，進而降低丁醇對菌體的毒性影響。倘若能夠使用新型低耗能的分離方式，必將大大降低生產成本。文獻指出滲透蒸發(pervaporation)等分離技術的應用，是相當有未來發展的潛力(Huang et al., 2001)。

表 2-6 ABE 發酵結合滲透蒸發之效能比較

文獻中表 2-6 為不同薄膜下所得到的結果。

membrane	thickness (μm)	Membrane area(cm^2)	Vacuum (mbar)	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Total flux ($\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$)	$\alpha_{\text{BuOH/water}}$	Permeate Butanol Concentration (g L^{-1})
PDMS	250	2500	Sweep gas	37	10.40	11.00	-
Liquid membrane	-	1500	-	30	14.30	66.00	230.00
Silicone	600	1600	Sweep gas	41	25.1–34.8	9.27-18.8	26.4–95.4
Ionic liquidmembrane/ ceramic	-	110	-	37	-	7-15	45–62
PDMS/polyethylene/ perforated alloy metal	-	73.25	<1.3	37	57	18-20	-
PDMS/ceramic	-	48.90	<3.9	37	626–741	8.3-21.4	-
PDMS	1	270	19.90	35	349–418	13.7-15.78	35.3–64.0

membrane	Duration of pervaporation (hr)	Operation	Micro-organism	Maximal solvent Productivity (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Productivity enhancement by pervaporation(%)	reference
PDMS	170	Continuous, immobilized	<i>C. species</i> DSM2152	-	-	Groot and Luyben (1987)
Liquid membrane	350	Continuous, immobilized,	<i>C. isopropylicum</i> IAM 19239	-	-	Matsumura et al. (1992)
Silicone	51	Batch, freely suspended	<i>C. beijerinckii</i> BA101	0.69	103	Qureshi and Blaschek (1999c)
Ionic liquid membrane/ ceramic	~418	Continuous, freely	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	2.34*	70	Izák et al. (2008)
PDMS/polyethylene/ perforated alloy metal	28	Fed-batch	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	-	-	Li et al. (2011a)
PDMS/ceramic	36	Batch, freely suspended	<i>C. acetobutylicum</i> XY16	-	-	Liu et al. (2011)
PDMS	475	Continuous, 2stage, freely	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	0.37	48–130	Wouter et al. (2012)

*Addition of n-butanol in medium during continuous fermentation.

第三章 材料與方法

3.1 實驗材料

3-1.1 實驗菌株

本實驗所採用的菌株 *Clostridium acetobutylicum*，是購自生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center)，菌種編號：BCRC10639。

3-1.2 實驗藥品

本實驗使用之藥品於下列表 3-1。

表 3-1 實驗藥品清單

中文名	英文名	廠牌
胰化蛋白胨	Tryptone	DIFCO BD
酵母萃取物	Yeast Extract	DIFCO BD
鉬酸鈉	Sodium molybdate dehydrate	昭和化學株式會社
硫酸	Sulfuric acid	SHOWA
硫酸鈉	Sodium sulfate	聯工化學試藥
硫酸銅	Cupric sulfate	SHOWA
硫酸錳	Manganese sulfate monohydrate	Scharlau
硫酸鎂	Magnesium sulfate heptahydrate	SHOWA
硫酸鋅	Zinc sulfate heptahydrate	SHOWA
磷酸氫二鉀	Dipotassium hydrogenphosphate	SHOWA
對氨基苯甲酸	p-aminobenzoic acid	ACROS
生物素	Biotin	SIGMA
氯化鈣	Calcium dichloride dihydrate	聯工化學試藥

氯化鈷	Cobalt dichloride hexahydrate	Hanawa
氯化鐵	Ferric chloride	SHOWA
醋酸	Acetic acid	SHOWA
丁酸	Butanoic acid	ACROS
丙酮	Acetone	TEDIA
乙醇	Ethanol	ECHO
丁醇	Butanol	ACROS
鹽酸	Hydrochloric acid	Scharlau
氫氧化鈉	Sodium Hydroxide	SHOWA
葡萄糖	Glucose	ROQUETTE
甘油	Glycerol	SHOWA
RCM	Reinforced clostridial medium	DIFCO BD
聚醚-聚醯胺嵌段共聚物	Pebax [®] 2533	Atofina Inc.
多壁奈米碳管	FloTube 9000	Cnano

3-1.3 實驗儀器

本實驗使用之儀器於下列表 3-2。

表 3-2 實驗儀器清單

儀器設備	型號	廠牌
pH meter	PH-206	Lutron
電子天平	BJ 100M	Precisa
磁石攪拌加熱器	MS-3205B	ChromTech
高壓蒸氣滅菌釜	EA635	TRIDENT
無菌操作台	3BH-24	HIGH TEN

超純水製造機	Simplicity	MILLIPORE
微電腦蒸餾水製造機	WSC044	FIDTREEM
加熱反應器	CR 2200	Weilheim
恆溫震盪培養箱	LUS-150	LIAN SHEN
微量離心機	MCD-2000	HSIANGTAI
高速中型離心機	Universal-32R	Hettich
試管震盪器	MS1 minishaker	IKA
超音波震盪器	DC300H	DECTA
分光光度計	GENESYS 10UV	Thermo
葡萄糖分析儀	2300STAT	YSI
氣相層析儀	Focus GC	Thermo
烘箱	LO-150	LIAN SHEN
5 L 液態發酵槽	BTF-A 5L	頂生
陶瓷過濾模組	Pore size 0.1 μ m	精良準
球磨機	BM-052	SHIN KWANG
厚度計	GT-313-A	GOTECH
滲透蒸發薄膜設備	—	膜旺
蠕動泵浦	Masterflex L/S Drives 07553-75	Cole-Parmer
活塞式無油真空泵浦	DP-120H	VACUTRONICS INC.
Body Tubes	1-6232	NAVITAR

3-2 分析方法

3-2.1 菌體濃度測量方法

離心管秤重，取不同濃度之菌液分別置入離心管中，經由離心機以轉速 9,000 rpm 離心 10 min 後，分離菌體和上清液。去除上清液，將菌體和離心管一同進入烘箱烘乾後秤重，測得菌體乾重 (Dry cell weight, DCW)。取不同濃度之菌液，利用分光光度計在波長 620 nm 下測量光學密度 (Optical density, O.D.)。依不同濃度所測得的 DCW 和 O.D. 值作圖，獲得檢量線： $DCW(g/l)=(O.D.-0.0258)/0.6796$

(附錄 1)

3-2.2 葡萄糖濃度測量方法

取菌液至離心管中，經由離心機以轉速 9,000 rpm 離心 10 min 後，分離菌體和上清液。取上清液，利用 YSI 2300STAT Glucose analyzer 來量測。

3-2.3 代謝產物 (acetone, ethanol, butanol, acetate, butyrate) 濃度測量方法

取菌液至離心管中，經由離心機以轉速 9,000 rpm 離心 10 min 後，分離菌體和上清液。取上清液並用 Filter 過濾，利用氣相層析儀 (Thermo model Focus GC series) 來量測。毛細管柱為 SEG BP20(25 m×0.22 mm×0.25 μm)，起始溫度 120°C，維持 3 min 後以 16°C/min 之速率升溫至 200°C，維持 5 min；注射孔 (injector)，溫度 200°C；偵測器為火焰離子偵測器 (FID detector)，溫度 250°C；運送氣體 (carrier gas) 為氮氣 (nitrogen)，流量 25 ml/min。注射上清液體積為 1 μl。

波峰面積和代謝產物濃度作圖，獲得檢量線：

acetone: Concentration(g/l)=Area/366019; ethanol: Concentration(g/l)=Area/379851 ;

butanol: Concentration(g/l)=Area/593913; acetate: Concentration(g/l)=Area/499784 ;

butyrate : Concentration(g/l)=Area/523845 (附錄 2-附錄 6)。

3-3 實驗方法

3-3.1 菌種保存

購自生物資源保存及研究中心，編號 BCRC10639 的 *C. acetobutylicum* 之冷凍乾燥管，接入種瓶培養基活化，置入含厭氧產氣包的厭氧罐，於恆溫震盪培養箱中，以 37°C 培養 30 小時。取 0.8 ml 菌液和 0.2 ml 甘油置入微量離心管中混合均勻，通入含有 50% CO₂ 和 50% N₂ 之混合氣體後，放入 -20°C 冰箱冷凍保存。

3-3.2 菌種活化

取保存於 -20°C 冰箱內冷凍保存的種菌，利用加熱反應器加熱至 70°C 活化菌體 2 min 後，接種至種瓶培養基，置入含厭氧產氣包的厭氧罐，於恆溫震盪培養箱中，以 37°C 培養 30 小時。

3-3.3 種菌培養基

本實驗種菌所採用的培養基如表 3-3。依下述比例配製成的培養基，即為 Reinforced clostridial medium (RCM)，以 1 N NaOH 調整 pH 值為 6.8。

表 3-3 種菌培養基 (seed medium, SM)

Compounds	Concentration (g/l)
'Lab-lemco' powder	10
Peptone	10
Soluble starch	1
Glucose	5

Cysteine · HCl	0.5
NaCl	5
CH ₃ COONa	3
Agar	0.5
Yeast extract	3

3-3.4 發酵培養基

本實驗發酵所採用的培養基如表 3-4。依下述比例配製成的培養基，以 1 N

HCl 調整 pH 值為 4.8。Glucose 濃度依實驗需求不同而改變。

表 3-4 發酵培養基 (fermentation medium, FM)

Compounds	Concentration (g/l)
Na ₂ SO ₄	0.18
K ₂ HPO ₄	0.175
Tryptone	1
Yeast extract	5
Glucose	80
Biotin	0.01
p-aminobenzonic acid	0.01
Mineral salt solution	1 ml

表 3-5 為無機鹽溶液 (Mineral salt solution) 的組成比例。為發酵培養基中之成分-Mineral salt solution。

表 3-5 Mineral salt solution 組成

Compounds	Concentration (g/l)
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.24
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.24
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.5
FeCl ₃	16.203
CuSO ₄	0.1598
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.5164
MnSO ₄ · H ₂ O	1.7
MgSO ₄ · 7H ₂ O	24.574
H ₂ SO ₄ (6M)	28 ml

3-3.5 接菌

將活化後SM之玻璃試管與滅菌後FM發酵槽以75 %酒精噴灑，置入無菌操作台。取250ml SM加至2500ml發酵槽後，放置發酵反應器上，通入混合氣體(50 %CO₂ 和50 %N₂)並以恆溫水槽通入雙夾套中控制溫度為37 °C，轉速設定為30R.P.M。

3-3.6 PEBA 薄膜的製備

取5%PEBA(g/g)和95%丁醇(g/g)放入圓底瓶混和，在80 °C下迴流(Reflux)並以磁石攪拌直到PEBA完全溶解；然後取適量溶液倒在玻璃平板上，靜置於室溫下一天，移除溶液中的氣泡；接著把玻璃放進70 °C烘箱一天，使溶劑揮發，將玻璃上的薄膜取下後，置於50 °C真空烘箱中乾燥兩天。薄膜厚度約為50 $\mu\text{m} \pm 10\mu\text{m}$ 。

3-3.7 PEBA/CNTs 複合膜的製備

取5%PEBA(g/g)和95%丁醇(g/g)放入圓底瓶，在80 °C下迴流並以磁石攪拌直到PEBA完全溶解後，以PEBA：CNTs=95%：5%的添加比加入圓底瓶混合，持續攪拌30min後，將溶液倒進球磨機內混和，球磨時間為14天。

取適量球磨後的液體倒在玻璃平板上，於室溫下靜置一天，移除溶液中的氣泡；然後，把玻璃放進70 °C烘箱一天，使溶劑揮發，接著將玻璃上的薄膜取下，置於50 °C真空烘箱中乾燥兩天，乾燥的薄膜厚度約為50 $\mu\text{m} \pm 10\mu\text{m}$ 。

本研究分別製備PEBA：CNTs=95%：5%和PEBA：CNTs=90%：10%的薄膜(即為5%和10%的CNTs添加量)。

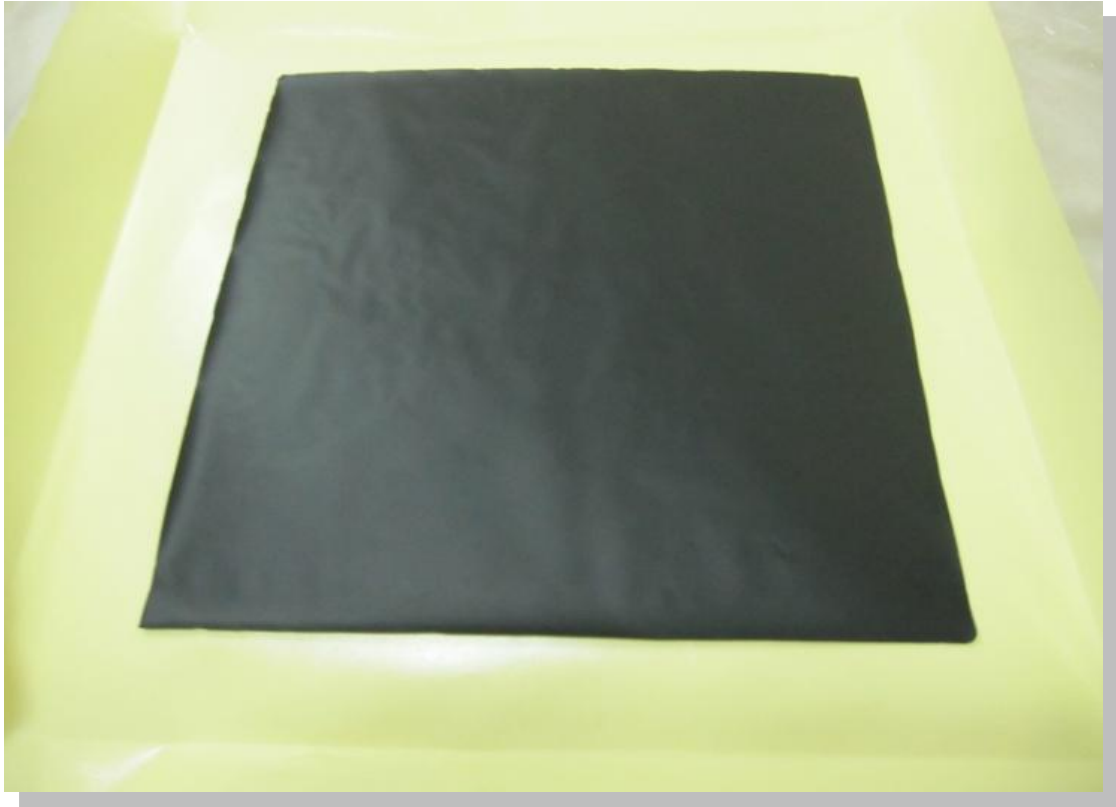
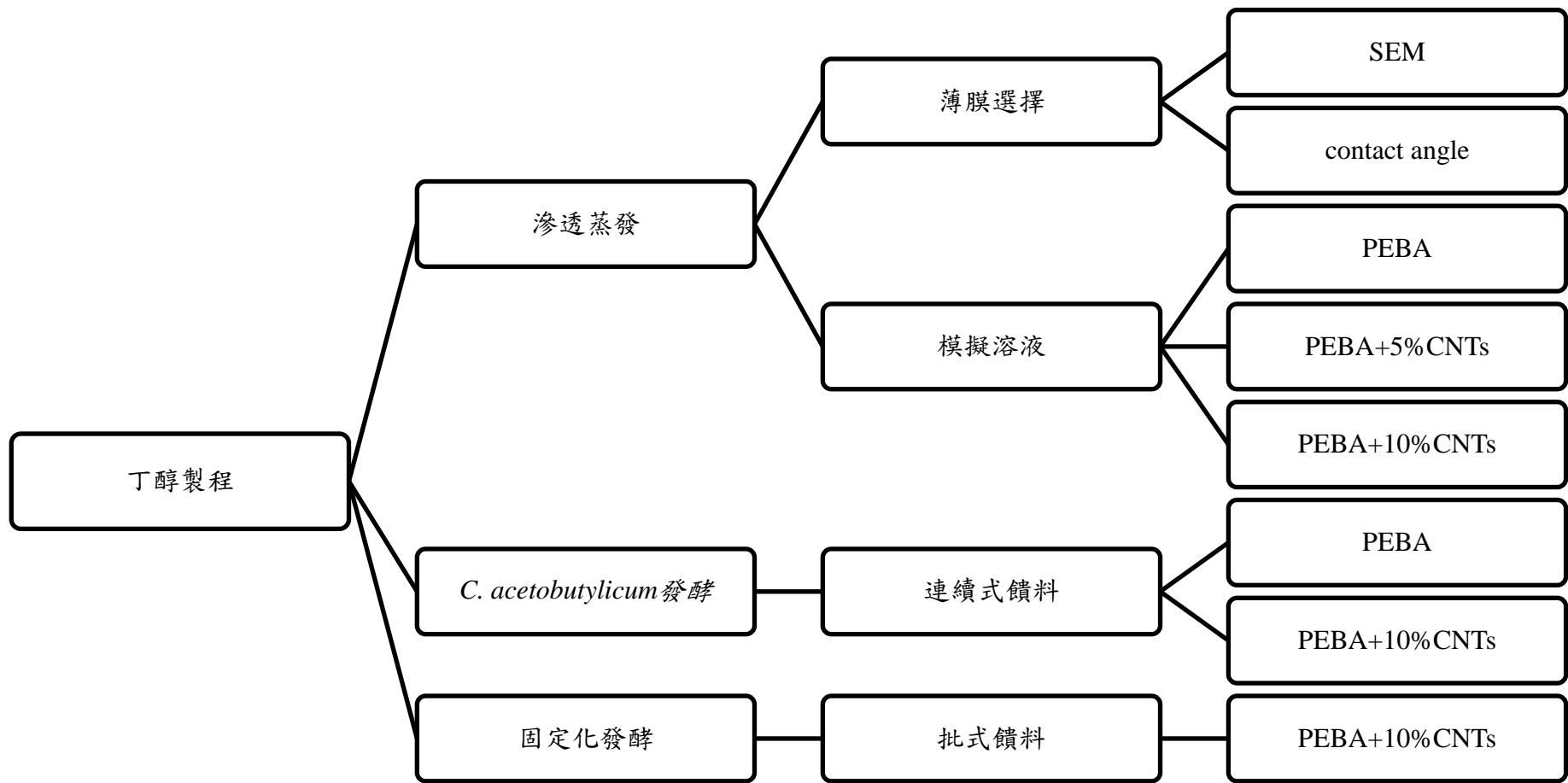


圖 3-1 PEBA+10CNTs 薄膜

3-4 實驗架構



3-5 實驗步驟

3-5.1 奈米碳管在 PEBA 中的分布情形之探討

目的：觀察奈米碳管分布之均勻性。

薄膜清洗，薄膜浸泡在去離子水中，放入烘箱烘乾。

以鑷子將薄膜放置於碳膠帶上，鍍金 20 秒後取出，加入液態氮，並將鍍金後的樣品放入，即可觀察。

3-5.2 以去離子水分別對 PEBA、PEBA+5% CNTs、PEBA+10% CNTs 薄膜接觸角的探討

目的：觀察接觸角度去說明薄膜的疏水性。

薄膜清洗，薄膜浸泡在去離子水中，放入烘箱烘乾。

以鑷子將 PEBA、PEBA+5% CNTs、PEBA+10% CNTs 薄膜分別至於載台上，架設 Body Tubes (6.5X Zoom, 3 mm FF)和載台平行，利用去離子水取一水珠於薄膜上，再調整 Body Tubes 焦距對焦。

3-5.3 以模擬溶液分別對 PEBA、PEBA+5% CNTs、PEBA+10% CNTs 薄膜探討

目的：探討不同 CNTs 比例添加對丁醇的移除效果。

模擬溶液製備 4 g/L 丙酮、8 g/L 丁醇、1.33 g/L 乙醇、3.5 g/L 乙酸、3.5 g/L 丁酸，配置 1 L 儲存槽中。雙夾套儲存槽溫度控制在 37 °C。PEBA、PEBA+5% CNTs、PEBA+10% CNTs 的平均厚度為 50 μm ，並且將薄膜置入板框中。

啟動蠕動幫浦將模擬溶液注入板框中循環，其薄膜接觸面積為 0.08 m^2 。

開啟真空幫浦並開始計時，每 30 min 分別在收集瓶和儲存槽取樣，記錄體積和模擬溶液濃度變化。操作時間為 8 小時。

分別對 PEBA、PEBA+5% CNTs、PEBA+10% CNTs 薄膜進行測試。

3-5.4 以 PEBA+10% CNTs 作為滲透蒸發之薄膜對發酵槽中丁醇移除

目的：探討同步以葡萄糖饋料結合滲透蒸發移除發酵槽中丁醇之影響。

前培養 250 ml SM，培養 30 小時。

配置 2.5 L FM 於 5 L 的發酵槽中，以 10%(v/v)的 SM 接菌量接於 5 L 的發酵槽中，並通入混合氣(50% N₂ 和 50% CO₂) 維持厭氧環境。轉速控制：30 R.P.M，溫度控制：37 °C。

當發酵槽內菌體生長 24 小時，將發酵液(含菌體)利用蠕動幫浦注入陶瓷過濾模組進行菌體與發酵液分離。

澄清發酵液流入 PV 系統開始進滲透蒸發移除產物程序，同時開始進行葡萄糖饋料，總發酵時間為 84 小時，滲透蒸發操作時間為 24 小時。

3-5.5 5-L 攪拌式發酵槽菌種固定化並連續式饋料以 PEBA、PEBA+10% CNTs

薄膜用於滲透蒸發移除丁醇

目的：探討長時間運作於連續饋料葡萄糖結合滲透蒸發移除發酵槽中丁醇之影響。

前培養 250 ml SM，培養 30 小時。

配置 2.5 L FM 於 5 L 的發酵槽中，並且添加 20%(w/v)的磚頭(粒徑 0.84-2.34 mm、

填充量 500 g)。

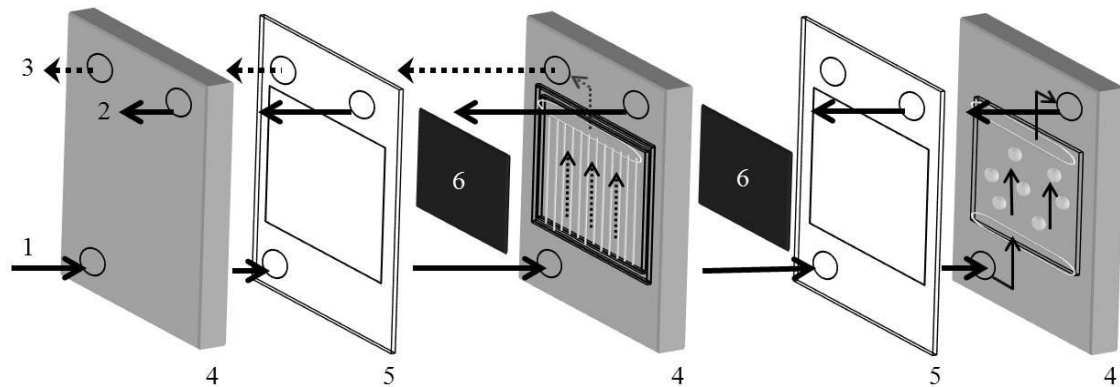
以 10%(v/v)的 SM 接菌量接於 5 L 的發酵槽中，通入混合氣(50% N₂ 和 50% CO₂)

維持厭氧環境。轉速控制：30 R.P.M，溫度控制：37 °C。

當發酵槽內菌體生長 24 小時，將發酵液(含菌體)利用蠕動幫浦注入薄膜膜組，

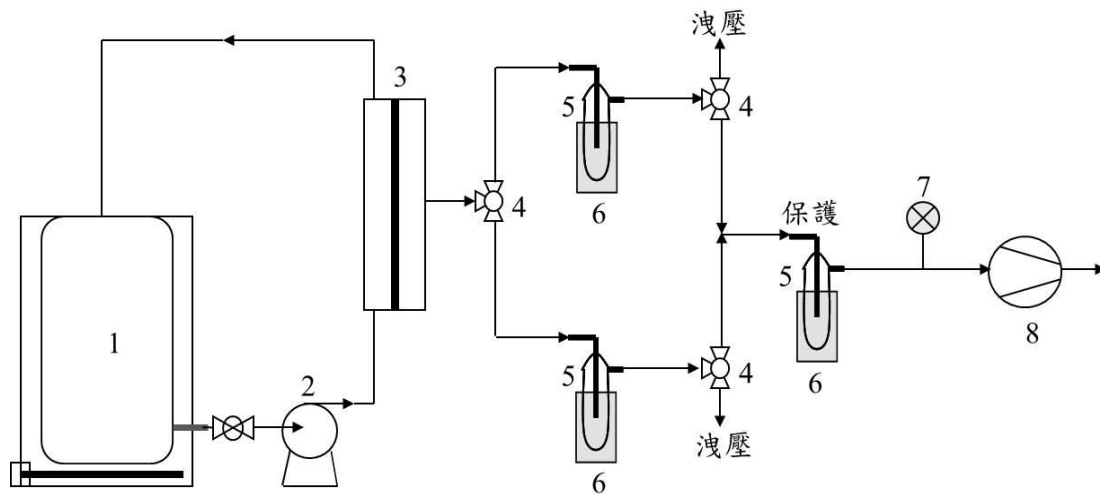
開始進滲透蒸發移除產物程序，同時開始進行葡萄糖饋料，總發酵時間為 190

小時，滲透蒸發操作時間為 166 小時。



1.feed 2.retentate 3.permeate 4.板 5.墊片 6.薄膜

圖 3-2 滲透蒸發膜組示意圖



1. 固定化發酵槽 2. 蠕動泵浦 3. 滲透蒸發膜組 4. 三相閥
5. 玻璃收集管 6. 液態氮瓶 7. 壓力計 8. 真空泵浦

圖 3-3 滲透蒸發管路示意圖

第四章 結果與討論

4-1 奈米碳管在 PEBA 中的分布情形之探討

利用SEM觀察複合膜表面與冷凍剝裂的截面，得知CNT在膜內的分散情形，由SEM觀察10% CNTs鑲嵌於PEBA表面，其餘皆埋在PEBA裡，由圖4-1和圖4-2可看出CNTs於表面的分散效果；圖4-3和圖4-4為側面圖可以判斷出碳管大部分排列方向與薄膜法線向量呈垂直方向。碳管表面呈現強的疏水性，不容易與水分子接觸且有利於有機分子吸附薄膜表面；排列方向與薄膜製作過程相關，其溶液鑄造過程中，溶液的流動和地吸引力所致。由於CNTs側面管壁無法滲透，碳管和薄膜滲透方向垂直，分子在薄膜內的擴散路程遠比PEBA大。導致碳管在一定添加量後，其擴散效應大於吸附速率。

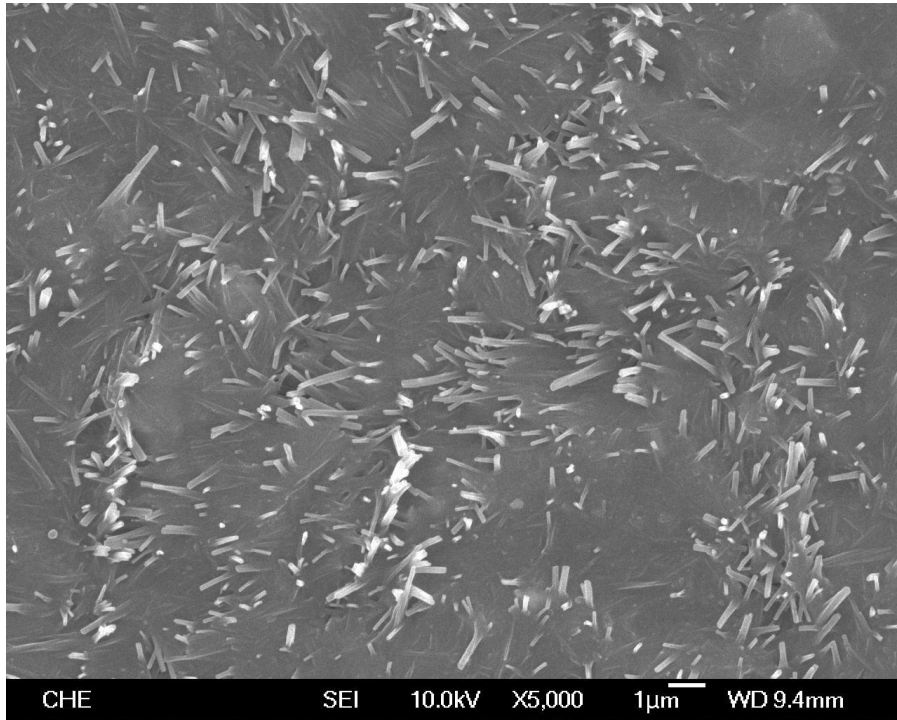


圖 4-1 PEBA+10%CNT 表面×5000

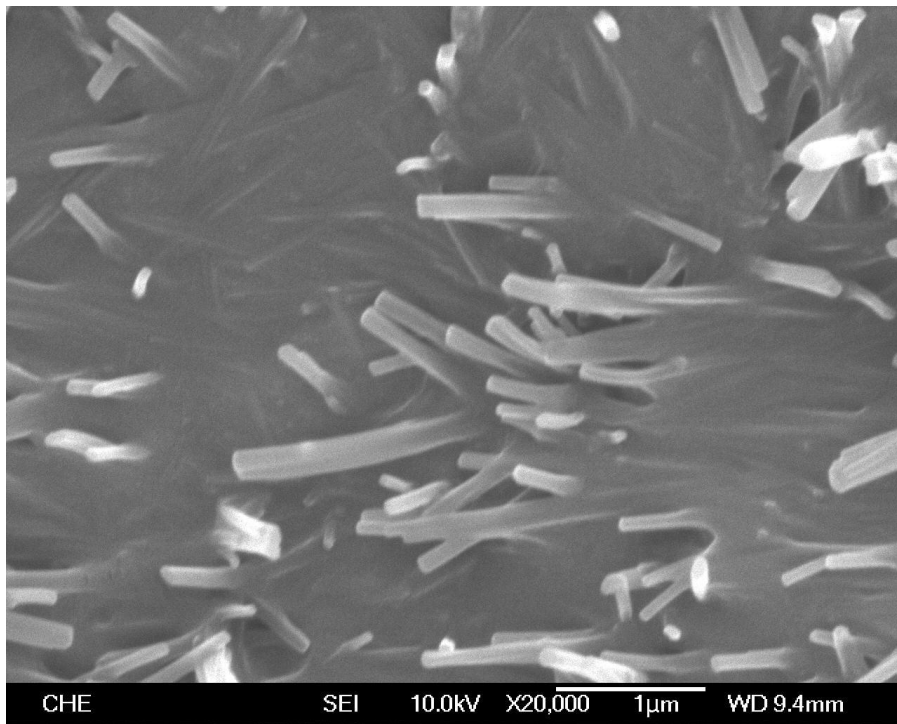


圖 4-2 PEBA+10%CNT 表面×20000

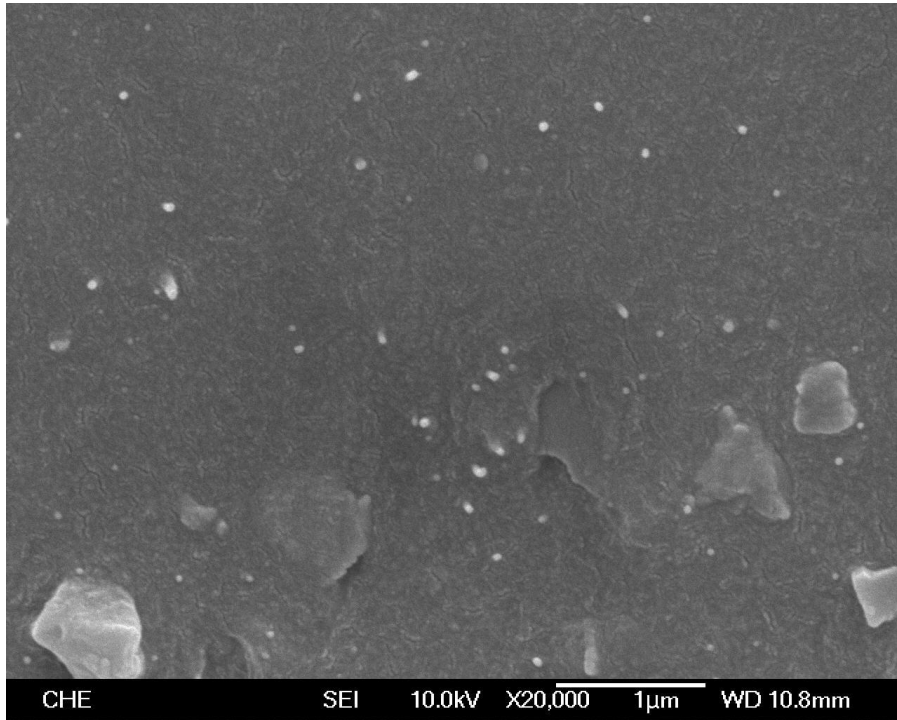


圖 4-3 PEBA+10%CNT 側面×20000

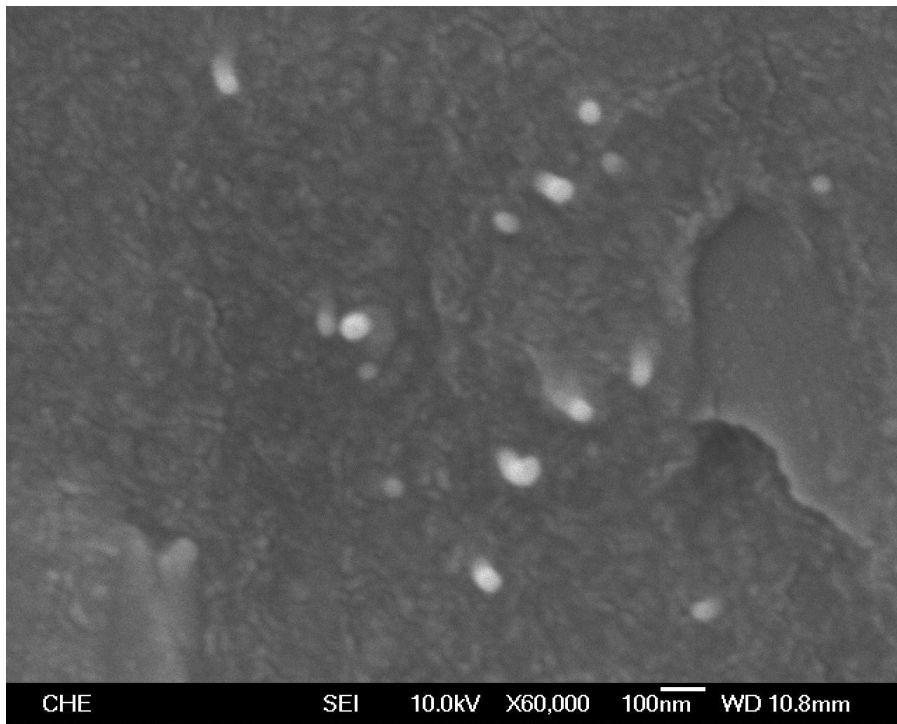


圖 4-4 PEBA+10%CNT 側面×60000

4-2 以去離子水分別對 PEBA、PEBA+5% CNTs、PEBA+10% CNTs 薄膜接觸角度的探討

疏水性對滲透蒸發影響主因是液體分子中還有水相和有機相，當分子接觸於薄膜介面時疏水性佳的會將水相和有機相分開，增加有機相對薄膜的接觸，圖 4-5 中在還沒添加 CNTs 時，為純 PEBA 其接觸角度較小。圖 4-6 中為添加 5% CNTs 其接觸角度大幅上升。圖 4-7 添加 10% CNTs 時接觸角度和添加 5% CNTs 時約略相同。表 4-1 中看出本實驗中添加 CNTs 的薄膜疏水性有明顯的大於沒有添加，但 CNTs 的添加量為 10% 時疏水性和 5% 添加量相近。其值在誤差範圍內，在一定的添加量中會使得薄膜具有較佳的疏水性，添加量超過其最佳值後疏水性質變化改變不大，並非添加量越多越好；但又因為高的 CNTs 添加量會使得薄膜強度增加，以利於後續的發酵實驗條件。

表 4-1 薄膜接觸角度

membrane	PEBA	PEBA+5% CNTs	PEBA+10% CNTs
contact angle	67.14°	81.67°	77.67°

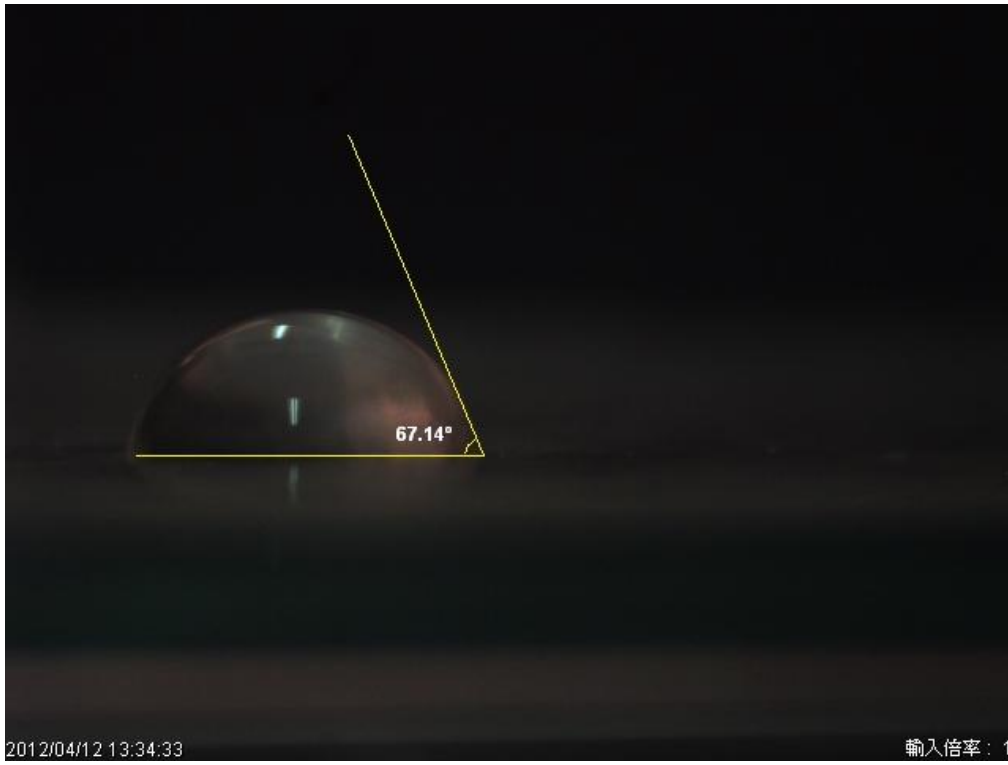


圖 4-5 PEBA contact angle

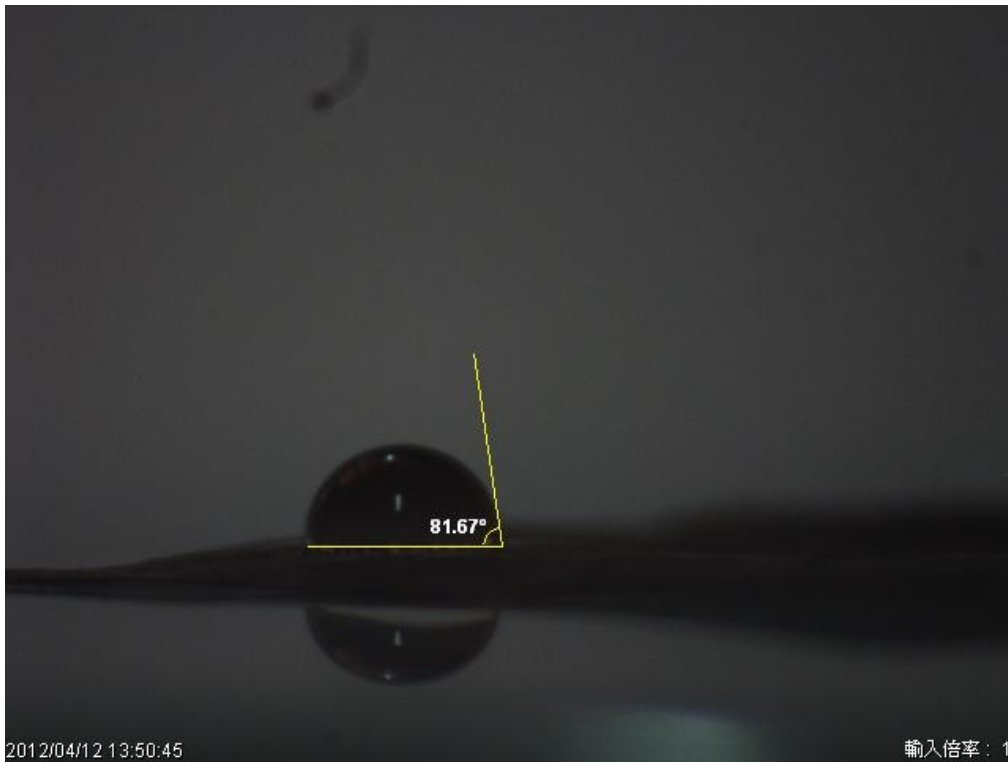


圖 4-6 PEBA+5%CNTs contact angle

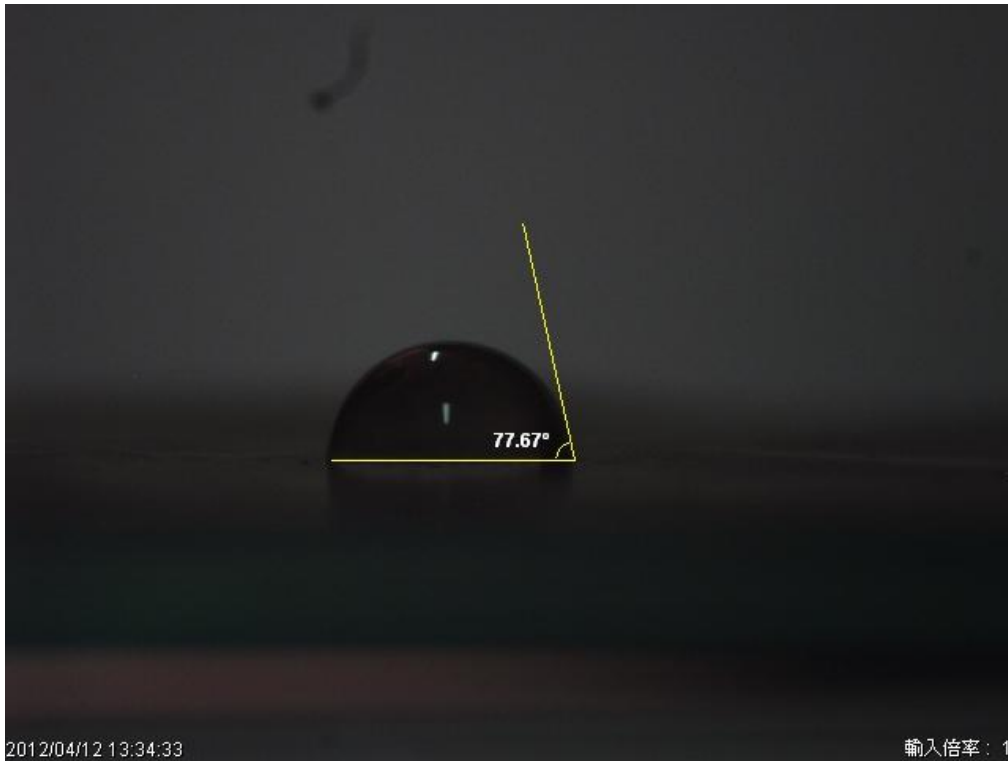


圖 4-7 PEBA+10%CNTs contact angle

4-3 以模擬溶液分別對 PEBA、PEBA+5% CNTs、PEBA+10% CNTs 薄膜探討

本次實驗探討不同 CNT 比例的薄膜分別對 PEBA、PEBA+5% CNTs、PEBA+10% CNT 做滲透蒸發移除儲存槽內模擬溶液變化。自從奈米碳管發現後，陸續引發和奈米碳管的研究，本實驗將滲透蒸發系統應用於移除丁醇之薄膜 PEBA 以不同奈米碳管比例添加，探討丁醇移除速率的影響。實驗結果如圖所，在 8 g/L 丁醇、4 g/L 丙酮、1.33 g/L 乙醇、3.5 g/L 乙酸和 3.5 g/L 丁酸之模擬溶液中，添加奈米碳管後的薄膜，圖 4-8 中明顯可以看出槽內丁醇濃度的下降速率，遠大於純 PEBA 薄膜。由表 4-2 得知 PEBA、PEBA+5% CNTs、PEBA+10% CNTs 的丁醇通量分別為 $9.975 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ 、 $16.095 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ 、 $15.875 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ，在表 4-3 中得知其選擇比為 17.4、19.4、18，滲透蒸發兩個重要的數值中皆可以看出添加碳管後的丁醇移除效果上升。本實驗所用的薄膜厚度為 $50 \mu\text{m}$ ，根據薄膜不同的厚度丁醇通量亦會隨之改變，薄膜越薄丁醇通量越高，但是在長時間滲透蒸發操作下，較薄的薄膜更容易造成薄膜的損傷並導致洩漏的現象產生。奈米碳管有高機械強度，再添加奈米碳管後的 PEBA 薄膜，其強度亦會增強。故本實驗接下來以 PEBA+10% CNTs 薄膜做長時間滲透蒸發。

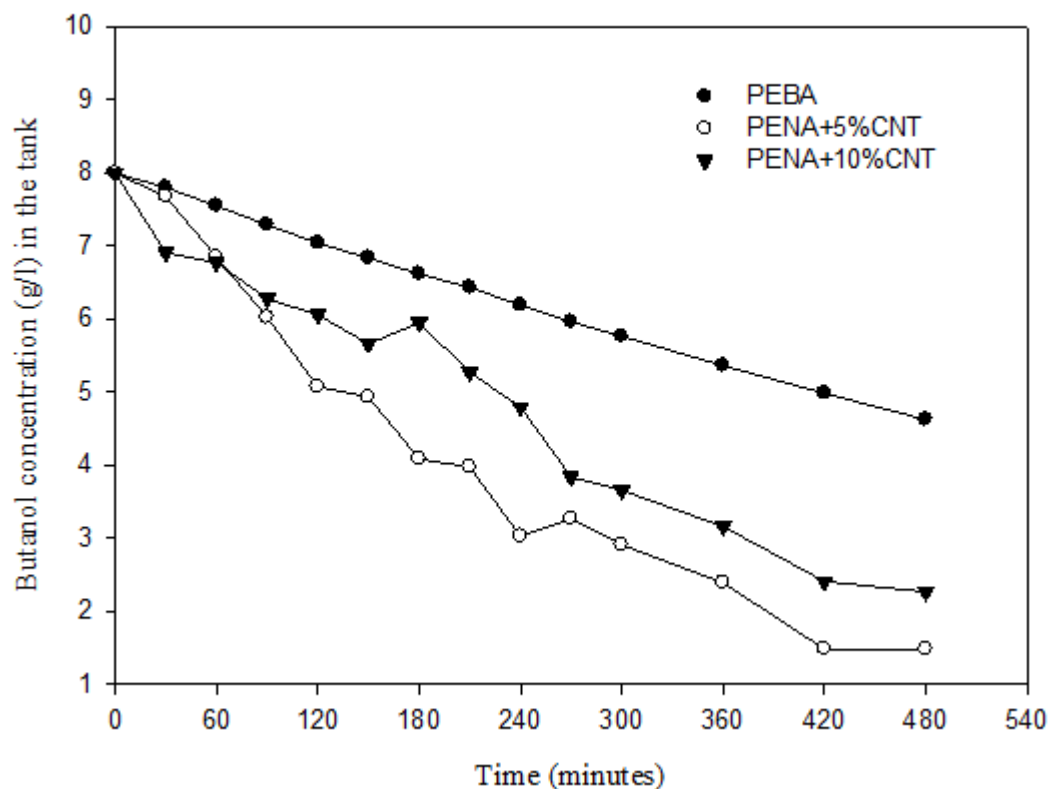


圖 4-8 模擬溶液槽內之丁醇濃度變化

表 4-2 不同薄膜的丙酮、乙醇、丁醇、乙酸、丁酸通量

membrane	acetone flux (g m ⁻² h ⁻¹)	ethanol flux (g m ⁻² h ⁻¹)	butanol flux (g m ⁻² h ⁻¹)	acetic acid flux (g m ⁻² h ⁻¹)	butyric acid flux (g m ⁻² h ⁻¹)
PEBA	0.906	1.718	9.975	1.022	2.449
PEBA+5% CNT	10.307	2.667	16.095	0.625	1.503
PEBA+10% CNT	10.089	3.127	15.875	0.776	1.707

表 4-3 不同薄膜的總通量、丁醇選擇比、滲透蒸發分離指數

membrane	J(g/m ² h)	α of butanol	PSI(g/m ² h)
PEBA	85	17.4	1386
PEBA+5% CNT	153	19.4	2817
PEBA+10% CNT	139	18	2367

4-4 以 PEBA 作為滲透蒸發之薄膜對發酵槽中丁醇移除

本實驗將葡萄糖饋料與滲透蒸發系統結合，在開始饋料的同時開始進行滲透蒸發的操作，從 24 小時到 48 小時總共歷時 24 小時，葡萄糖饋料濃度 50 (w/v) %、饋料流速為 15 ml/ hr 進行饋料，饋料時間與操作滲透蒸發時間一致，因此饋料體積與滲透蒸發移除體積大致相同，所以在此實驗並無稀釋效應(dilute effect)。

由圖 4-9 可得知，滲透蒸發操作期間丁醇濃度維持在 6-8 g/L，這是低於丁醇抑制濃度 10-15 g/L，由於滲透蒸發移除溶劑使得發酵槽內維持低丁醇濃度，這有助於菌體的生長並增加碳源之利用。不過，在滲透蒸發後期丙酮、丁醇和乙醇濃度在發酵槽內略有增加趨勢，這意味著丁醇的移除速率還是低於 *C. acetobutylicum* 的丁醇生產速率。未來可以藉由增加薄膜面積來改善。這說明了葡萄糖饋料同時進行滲透蒸發操作可以有效提高丁醇生產速率，這顯示透過滲透蒸發系統移除溶劑可避免丁醇大量累積積至發酵槽內，進一步在提高丁醇生產速率和產率。由此說明應用滲透蒸發系統和葡萄糖饋料在 ABE 發酵中生產丁醇具有相當不錯的潛力與可行性。

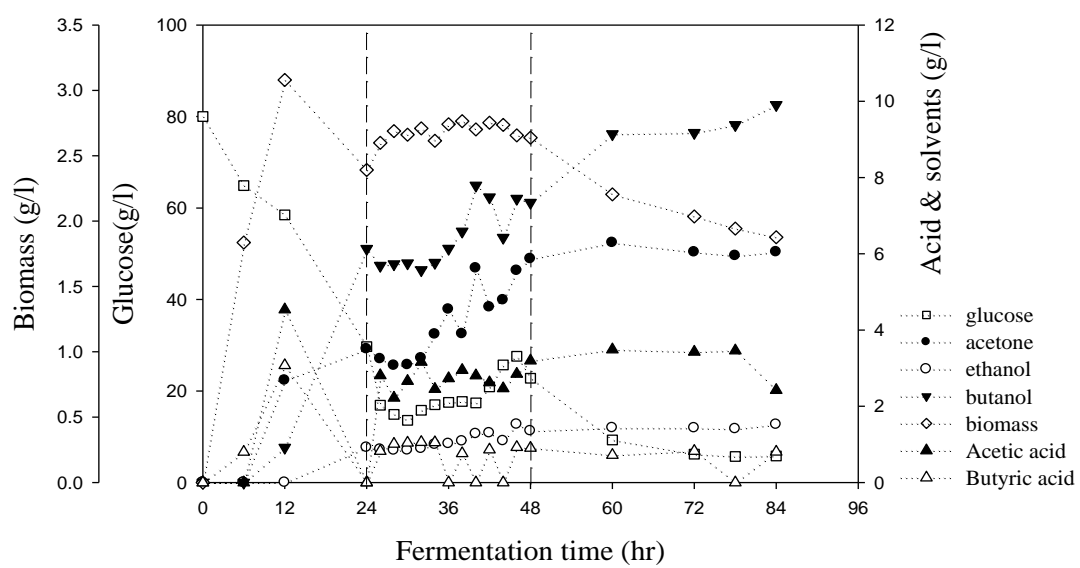


圖 4-9 應用 PEBA 薄膜操作滲透蒸發結合連續式饋料之 ABE 生產情形

4-5 以 PEBA+10%CNTs 作為滲透蒸發之薄膜對發酵槽中丁醇移除

本實驗將葡萄糖饋料與滲透蒸發系統結合，在開始饋料的同時開始進行滲透蒸發的操作，從 24 小時到 48 小時總共歷時 24 小時，葡萄糖饋料濃度 50 (w/v) %、饋料流速為 15 ml/ hr 進行饋料，饋料時間與操作滲透蒸發時間一致，因此饋料體積與滲透蒸發移除體積大致相同，所以在此實驗並無稀釋效應(dilute effect)。

由圖 4-10 可以知道滲透蒸發之後發酵槽內丁醇濃度持續上升，此時生長數率遠大於移除效率，當丁醇濃度到達高點時出現丁醇毒性抑制現象，使得菌體量慢慢下降，丁醇生產速率也隨之下降，脫離丁醇毒性抑制範圍時丁醇生產速率上升，導致槽內丁醇濃度在滲透蒸發時震盪，後段震盪越還越小趨於穩定。

由文獻可以得知在操作滲透蒸發結合發酵槽所得的當薄膜面積為 0.08m^2 時 productivity 為 0.22 g/l/h ，本實驗用的薄膜面積亦為 0.08 m^2 得到的 productivity 為 0.27 g/l/h (PEBA)、 0.34 g/l/h (PEBA+CNTs)，文獻中當薄膜面積為 0.16 m^2 時 productivity 上升至 0.65 g/l/h 。文獻中所用的薄膜皆為 PDMS。當薄膜面積增加可能加快丁醇的移除，以利於槽內菌體代謝丁醇，導致 productivity 上升。

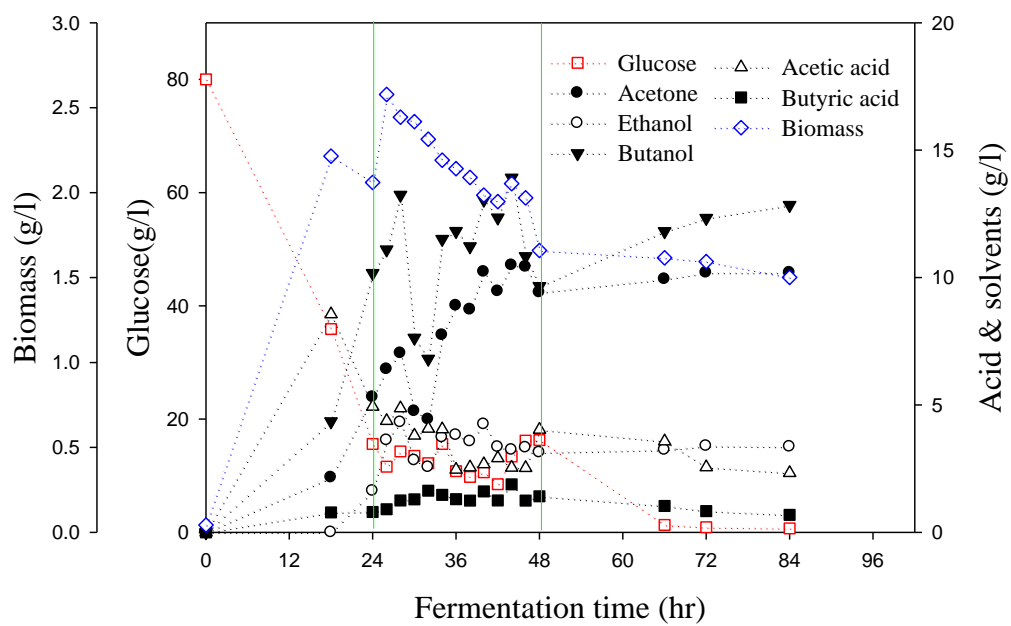


圖 4-10 應用 PEBA+10%CNT 薄膜操作滲透蒸發結合連續式饋料之 ABE 生產情形

形

綜合以上兩組實驗，探討滲透端收集的丁醇濃度，就由圖 4-11 得知添加 CNTs 所收集的平均丁醇濃度為 99.3 g/l，PEBA 的平均丁醇濃度為 71.2 g/l。由此可見有添加 CNTs 的薄膜滲透端丁醇濃度有明顯的上升許多。PEBA+CNTs 可以加快發酵槽內的丁醇移除速率，讓丁醇濃度低於毒性抑制濃度，這顯示改善薄膜操作滲透蒸發系統加速溶劑移除，可避免丁醇大量累積至發酵槽內，進一步在提高丁醇生產速率和產率。

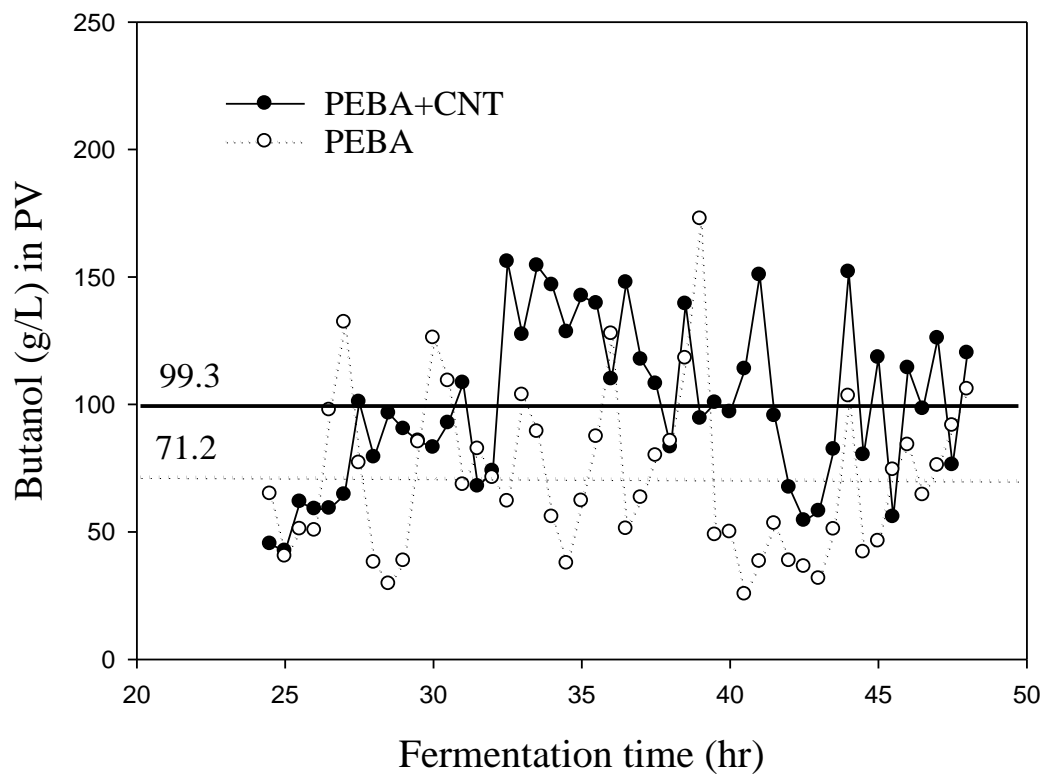


圖 4-11 不同薄膜的滲透端丁醇濃度

4-6 5-L 攪拌式發酵槽菌種固定化並批次式饋料以 PEBA+10% CNTs 薄膜用於滲透蒸發移除丁醇

本實驗將葡萄糖饋料與滲透蒸發系統結合，在開始饋料的同時開始進行滲透蒸發的操作，從 24 小時到 190 小時總共歷時 166 小時，葡萄糖饋料濃度 50 (w/v) %、FM 培養基，控制葡萄糖濃度和發酵槽內體積進行饋料，葡萄糖濃度控制在 20 ± 10 ，由操作滲透蒸發移除體積決定饋料體積，因此饋料體積與滲透蒸發移除體積大致相同，所以在此實驗並無稀釋效應(dilute effect)。

此實驗前端移除陶瓷過濾裝置，由圖 4-12 得知當開始操作滲透蒸發時菌體量稍微下降，但葡萄糖仍持消耗，表示菌體持續生長，在 48 小時丁醇濃度達到高點即為丁醇毒性抑制濃度，此時菌體開始死亡、停止代謝，滲透蒸發持續移除丁醇，使得丁醇濃度下降，菌體脫離毒性抑制濃度，菌體開始代謝，丁醇濃度、菌體量上升到一定範圍時開始穩定即丁醇代謝速率約等於丁醇移除速率，中間約 100 小時丁醇有波動應為饋料控制導致些微的稀釋效應，之後丁醇濃度又回歸到穩定，後段當停止葡萄糖饋料，葡萄糖濃度小於 10 g/l 時，菌體代謝丁醇能力下降，導致丁醇濃度下降，但菌體量仍然沒有太大變化。此程序的 yield 為 0.24 (g/g)。可以看出在製程中添加磚頭固定化菌種有助於丁醇產率。在於葡萄糖有效的利用且減少碳源轉化生成菌體。

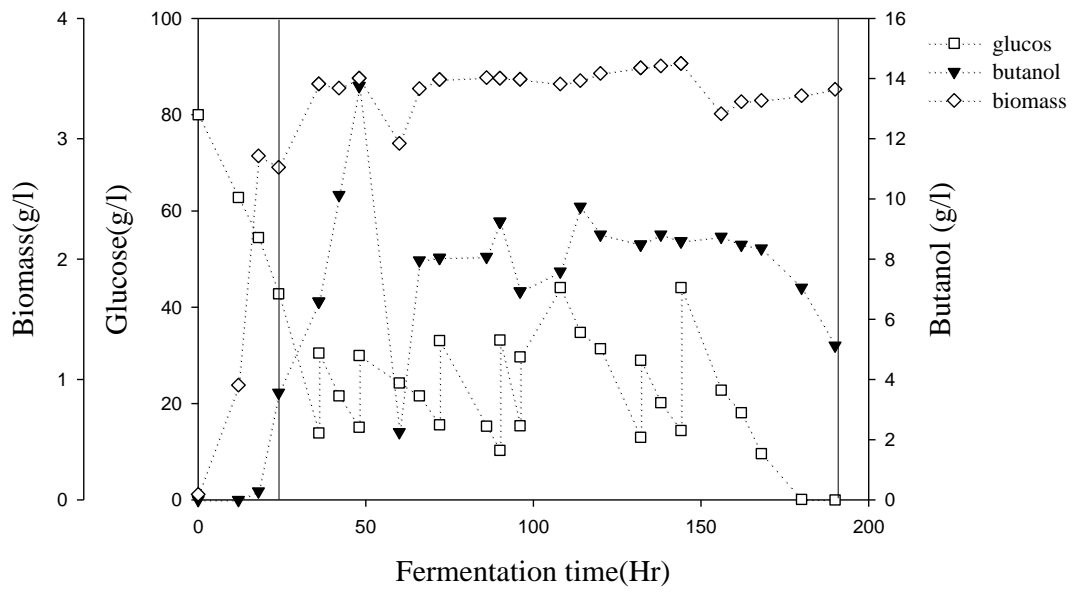


圖 4-12 應用 PEBA+10%CNT 薄膜操作滲透蒸發結合固定化批次饋料之 ABE 生

產情形

表 4-4 以不同薄膜操作滲透蒸發結合發酵槽。

文獻與此研究之比較如表 4-4

membrane	PV temp (°C)	Crossing Area (m ²)	Total Flux* (g/m ² /h)	α of butanol*	Butanol Produc.* (g/l/h)	Yield* (g/g)	Fermenter/membr. area (m ³ /m ²)	reference
PDMS	35	0.08	25-35	8.8-18.8	0.22	0.28	0.00875	Qureshi et al. (1999)
PDMS	35-37	0.16	26-31	7-19	0.65	0.3	0.005	Qureshi et al. (1999)
Silicalite filled PDMS	78	0.022	46-66	95-200	0.12	0.2	0.04545	Qureshi et al. (2001)
PDMS	37	0.007	57	14	-	-	0.06826	Li et al. (2011)
PEBA	37	0.08	161	14	0.27**	0.17	0.03125	this study
PEBA+CNTs (10%)	37	0.08	147	18	0.34**	0.20	0.03125	this study

*Some of data were converted from the values provided in the referred paper.

**The condensing process is used by liquid N₂.

PV is represented for pervaporation.

PDMS is represented for polydimethylsiloxane.

第五章 結論與未來展望

5-1 結論

- 一. 可以得知 CNT 混摻於 PEBA 中，經由球磨機球磨可以將 CNT 均勻分布於 PEBA 中。
- 二. 添加 CNT 的薄膜中，提高其疏水性，以利於滲透蒸發時的有機分子吸附於薄膜。
- 三. 添加 CNT 的薄膜在模擬溶液中，其移除速率明顯大於純 PEBA，用於 ABE 發酵可降低其丁醇毒性抑制，提高丁醇產率。
- 四. 在薄膜的選擇中，PEBA+10%CNT 和 PEBA+5%CNT 的移除效率相差不多，但 CNT 本身有高的機械強度，添加於 PEBA 中有助於增加薄膜機械強度，以利於長時間製程。
- 五. 在發酵製程中結合滲透蒸發選用 PEBA、PEBA+10%CNT 當薄膜，所得的 productivity 分別為 0.27、0.34 g/l/h，yield 分別為 0.17、0.20 g/g，明顯看出添加 CNT 薄膜用於滲透蒸發可增加丁醇的生產速率。
- 六. 在選用 PEBA+10%CNT 薄膜操作滲透蒸發應用於長時間固定化發酵，主要是固定化發酵增加菌體量，使得菌體快速代謝導致 yield 上升，此實驗的 yield 為 0.24 g/l/h。

5-2 未來方向

在薄膜方面可以嘗試減少厚度以增加丁醇的選擇比和通量，達到提升丁醇移除速率，降低發酵槽內丁醇濃度，使得 *C. acetobutylicum* 發酵有高的 yield 值。

利用不同技術製作讓奈米碳管以高密度分布於高分子複材中，以增加丁醇分子吸附能力，使得滲透蒸發更有效率的利用。在發酵過程以葡萄糖當作碳源，未來在綠色能源發展可以找尋替代性原料，如農業廢棄物 (waste) 與木質纖維 (lignocellulose)，以不同菌種發酵將替代性原料轉化為葡萄糖再結合 ABE 發酵和滲透蒸發，形成丁醇發酵製程，並開發自動化控制導入生產線中。

參考文獻

- Bahl H., Andersch W., Braun K., Gottschalk G. (1982). Effect of pH and butyrate concentration on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* grown in continuous culture. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 14:17–20.
- Bahl H., Andersch W., Gottschalk G. (1982). Continuous Production of Acetone and Butanol by *Clostridium acetobutylicum* in a Two-Stage Phosphate Limited Chemostat. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 15:201–205.
- Binning R.C., James F.E. (1958). Now separate by membrane permeation. *Petroleum Refiner* 37 214–215.
- Binning R.C., Jennings J.F., Martin E.C. (1962). Removal of water from organic chemicals. *U.S. Patent* 3,035,060
- Cen Y., Staudt-Bickel C., Lichtenthaler R. N. (2002). Sorption properties of organic solvents in PEBA membranes. *Journal of membrane science* , 206 ,341–349.
- Durre P. (2007). Biobutanol : An attractive biofuel. *Biotechnol Journal*, 2:1525–1534.
- El-Zanati E., Abdel-Hakim E., El-Ardi O., Fahmy M. (2006). Modeling and simulation of butanol separation from aqueous solutions using pervaporation. *Journal of Membrane Science*, 280, 278–283.

Ezeji T., Blaschek H. P. (2008). Fermentation of dried distillers' grains and solubles (DDGS) hydrolysates to solvents and value-added products by solventogenic clostridia. *Bioresource Technology*, 99, 5232–5242.

Ezeji T., Blaschek H. P., Qureshi N. (2007). Butanol Production From Agricultural Residues: Impact of Degradation Products on *Clostridium beijerinckii* Growth and Butanol Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 97, 1460–1469.

Farber L., (1935) Applications of pervaporation. *Science*, 82, 158.

Fouad E.A., Feng X. (2008). Use of pervaporation to separate butanol from dilute aqueous solutions: Effects of operating conditions and concentration polarization. *Journal of Membrane Science*, 323, 428–435

Frick C. H., Schugerl K. (1986). Continuous acetone-butanol production with free and immobilized *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 25:186–193.

Garcia V., Pakkilaa J., Ojamob H., Muurinena E., Keiskia R.L. (2011). Challenges in biobutanol production: How to improve the efficiency. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15, 964–980.

Groot W.J., Luyben K.C.A.M., (1987). Continuous production of butanol from a glucose/xylose mixture with an immobilized cell system coupled to pervaporation. *Biotechnology Letters*, 9, 867–870.

- Gryta M. (2002). The assessment of microorganism growth in the membrane distillation system. *Desalination*, 142, 79–88
- Hecke W. V., Vandezande P., Claes S., Vangeel S., Beckers H., Diels L., Wever H. D. (2012). Integrated bioprocess for long-term continuous cultivation of *Clostridium acetobutylicum* coupled to pervaporation with PDMS composite membranes. *Bioresource Technology*, 111, 368–377.
- Heisler E.G., hunter A.S., Siciliano J., Readway R.H. (1956). Solute and temperature effects in the pervaporation of aqueous alcoholic solution. *Science*, 124, 77–79.
- Huang J. (2001). Pervaporative recovery of n-butanol from aqueous solutions and ABE fermentation broth using thin-film silicalite-filled silicone composite membranes. *Journal of Membrane Science*, 92, 231–242.
- Huang J., Meagher M.M. (2001). Pervaporative recovery of n-butanol from aqueous solutions and ABE fermentation broth using thin-film silicalite-filled silicone composite membranes. *Journal of Membrane Science*, 192, 231–242.
- Huang R. Y. M., Feng X. (1993). Dehydration of Isopropanol by Pervaporation Using Aromatic Polyetherimide Membranes. *Separation Science and Technology*, 28.
- Huang R.Y.M. (1991). Pervaporation membrane separation process. *Elsevier Science Publishers B.V.*
- Huang R.Y.M., Yeom C.K. (1990). Pervaporation separation of aqueous mixtures

- using crosslinked poly(vinyl alcohol)(pva). II. Permeation of ethanol-water mixtures. *Journal of Membrane Science*, 151, 273–292
- Iijima S. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 35, 56–58.
- Izák, P., Schwarz, K., Ruth, W., Bahl, H., Kragl, U. (2008). Increased productivity of *Clostridium acetobutylicum* fermentation of acetone, butanol, and ethanol by pervaporation through supported ionic liquid membrane. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 597–602.
- Jones D. T. and Woods D. R. (1986). Acetone-Butanol Fermentation Revisited. *Microbiological Reviews*, 50, 484–524
- Kober P.A. (1917). Pervaporation perstillation and percrystallization. *Journal of American Chemical Society*, 39, 944–948.
- Kourkoutas Y., Bekatorou A., Banat I. M., Marchant R., Koutinas A. A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production:a review. *Food Microbiology*, 21, 377–397.
- Leland M. V. (2005). A review of pervaporation for product recovery from biomass fermentation processes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80, 603–629.
- Li S.Y., Srivastava R., Parnas R.S. (2011). Study of in situ 1-butanol pervaporation from A–B–E fermentation using a PDMS composite membrane: validity of

- solution–diffusion model for pervaporative A–B–E fermentation. *Biotechnol Progress*, 27, 111–120.
- Li S.Y., Srivastava R., Suib S.L., Li Y., Parnas R.S. (2011). Performance of batch, fed-batch, and continuous A–B–E fermentation with pH-control. *Bioresour. Technol*, 102, 4241–4250.
- Liu F., Liu L., Feng X. (2005). Separation of acetone–butanol–ethanol (ABE) from dilute aqueous solutions by pervaporation. *Separation and Purification Technology*, 42, 273–282.
- Liu G., Wei W., Wu H., Dong X., Jiang M., Jin W. (2011). Pervaporation performance of PDMS/ceramic composite membrane in acetone butanol ethanol (ABE) fermentation–PV coupled process. *Journal of Membrane Science*, 373, 121–129.
- Madiah M.S., Ariff A.B., Sahaid K.M., Suraini A.A., Karim M.I.A. (2001). Direct fermentation of gelatinized sago starch to acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 567–576.
- Matsumura M., Takehara S., Kataoka H., (1992). Continuous butanol/isopropanol fermentation in down-flow column reactor coupled with pervaporation using supported liquid membrane. *Biotechnology and Bioengineering*, 39, 148–156.
- Montoya D., Spitia S., Silva E., Schwarz W. H. (2000). Isolation of mesophilic

solvent-producing clostridia from Colombian sources: physiological characterization, solvent production and polysaccharide hydrolysis. *Journal of Biotechnology*, 79, 117–126.

Pfromm P. H., Amanor-Boadu V., Nelson R., Vadlani P., Madl R. (2010). Bio-butanol vs. bio-ethanol: A technical and economic assessment for corn and switchgrass fermented by yeast or *Clostridium acetobutylicum*. *Biomass and Bioenergy*, 34, 515–524.

Pilkington P. H., Margaritis A., Mensour N. A., Russell I. (1998). Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: a review. *Journal of the Institute of Brewing*, 104, 19–31.

Qureshi N., Blaschek H. P. (1999). Production of Acetone Butanol Ethanol (ABE) by a Hyper-Producing Mutant Strain of *Clostridium beijerinckii* BA101 and Recovery by Pervaporation. *Biotechnol Progress*, 15, 594–602.

Qureshi N., Blaschek H. P. (2000). Butanol production using *Clostridium beijerinckii* BA101 hyper-butanol producing mutant strain and recovery by pervaporation. *Appl Biochem Biotechnol*, 85, 225–235.

Qureshi N., Blaschek H. P. (2001). Recent advances in ABE fermentation : hyper-butanol producing *Clostridium beijerinckii* BA101. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 27, 287–291.

- Qureshi N., Blaschek H.P. (2001). Recovery of butanol from fermentation broth by gas stripping. *Renewable Energy*, 22, 557–564.
- Qureshi N., Ezeji T. C. (2008). Butanol, ‘a superior biofuel’ production from agricultural residues (renewable biomass): Recent progress in technolagricultural residues (renewable biomass): Recent progress in technology. *Biofuels Bioprod Biorefin*, 2, 319–330.
- Qureshi N., Lai L. L., and Blaschek H. P. (2004). Scale-up of a high productivity continuous biofilm reactor to produce butanol by adsorbed cells of *Clostridium beijerinckii*. *Institution of Chemical Engineers*, 82, 164–173.
- Qureshi N., Maddox I. S. (1995). Continuous Production of Acetone-Butanol-Ethanol Using Immobilized Cell of *Clostridium acetobutylicum* and Integration with Product Removal by Liquid-Liquid Extraction. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80, 185–189.
- Qureshi N., Maddox I. S., Friedl A. (1992). Application of continuous substrate feeding to the ABE fermentation: Relief of product inhibition using extraction, perstraction, stripping, and pervaporation. *Biotechnology Progress*, 8, 382–390.
- Qureshi N., Meagher M.M., Huang J., Hutkins R.W. (2001). Acetone butanol ethanol (ABE) recovery by pervaporation using silicalite–silicone composite membrane from fed-batch reactor of *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Membrane*

Science, 187, 93–102.

Ramey D. E. (2007). Butanol: The Other Alternative Fuel. *Agricultural Biofuels: Technology, Sustainability and Profitability*, 137–147.

Sanders B.H., Choo C.Y., (1960). Latest advances in membrane permeation. *Petroleum Refiner*, 133–138.

Zhang Y., Ma Y., Yang F., Zhang C. (2009). Continuous acetone-butanol-ethanol production by corn stalk immobilized cells. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 1117–1121.

吳建一、鍾宛真、葉修鋒.(2007). 固定化酵素之演進與展望. *化工*, 53:175-198.

周世凱、許梅娟.(2009). 新能源—生物產丁醇. *科學發展*, 433,26-31

成會明.(2004) 奈米碳管. 五南書局

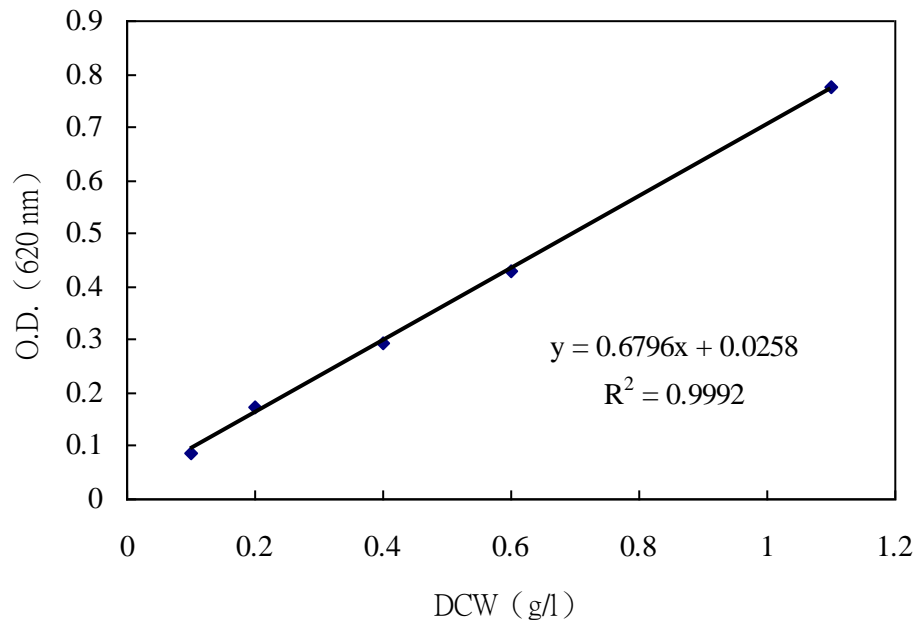
李瑞真(2011). 固定化 *Clostridium acetobutylicum* 進行連續式發酵生產丁醇之研究. 東海大學化學工程與材料工程學系碩士論文.

林尚甫(2011). 應用吸附法和滲透蒸發分離方法探討 *Clostridium acetobutylicum* 生產丁醇之影響. 東海大學化學工程與材料工程學系碩士論文.

潘慧雅(2012). 以奈米碳管複材膜對模擬丁醇發酵液的滲透蒸發. 東海大學化學工程與材料工程學系碩士論文.

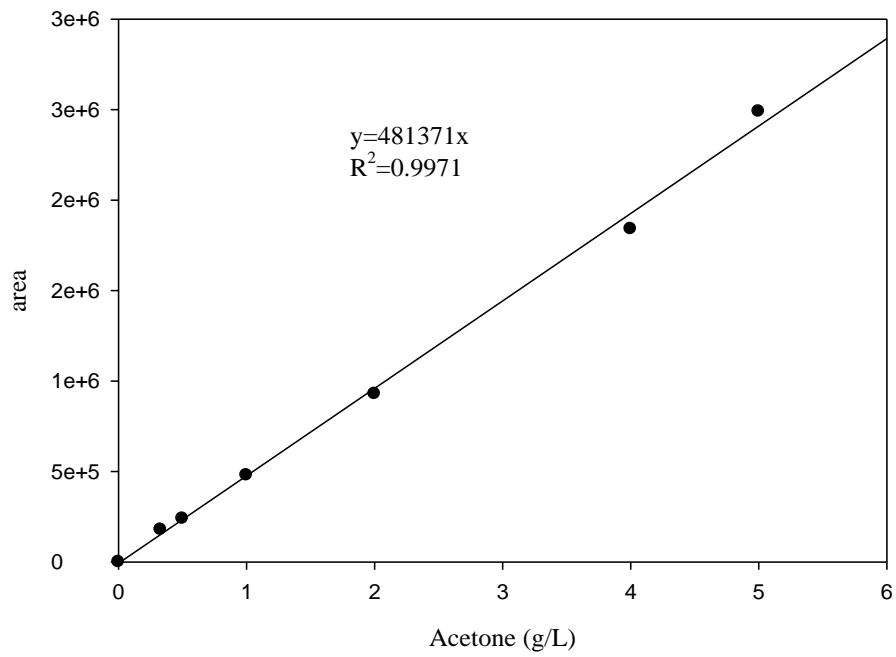
附 錄

附錄 1:菌體乾重 (biomass) 檢量線



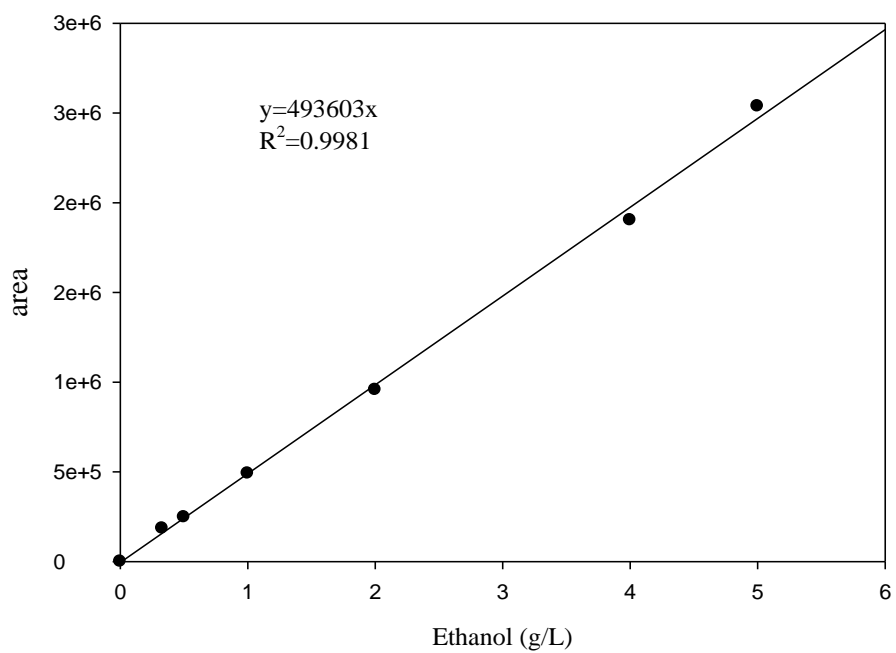
菌體乾重檢量線方程式： $DCW(g/l) = (O.D. - 0.0258) / 0.6796$

附錄 2:丙酮 (acetone) 檢量線



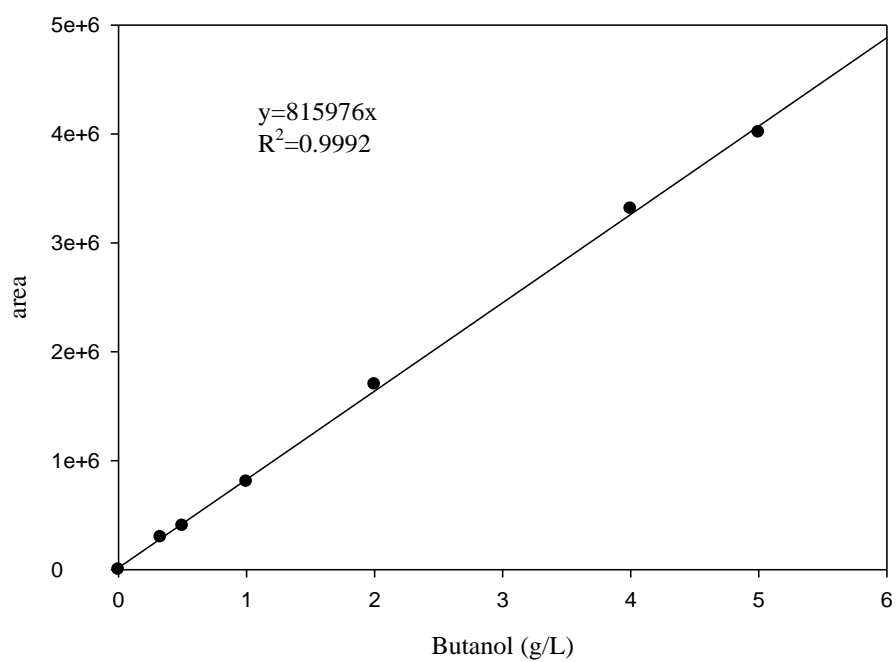
丙酮 (acetone) 檢量線方程式：Concentration(g/l)=area/481371

附錄 3:乙醇 (ethanol) 檢量線



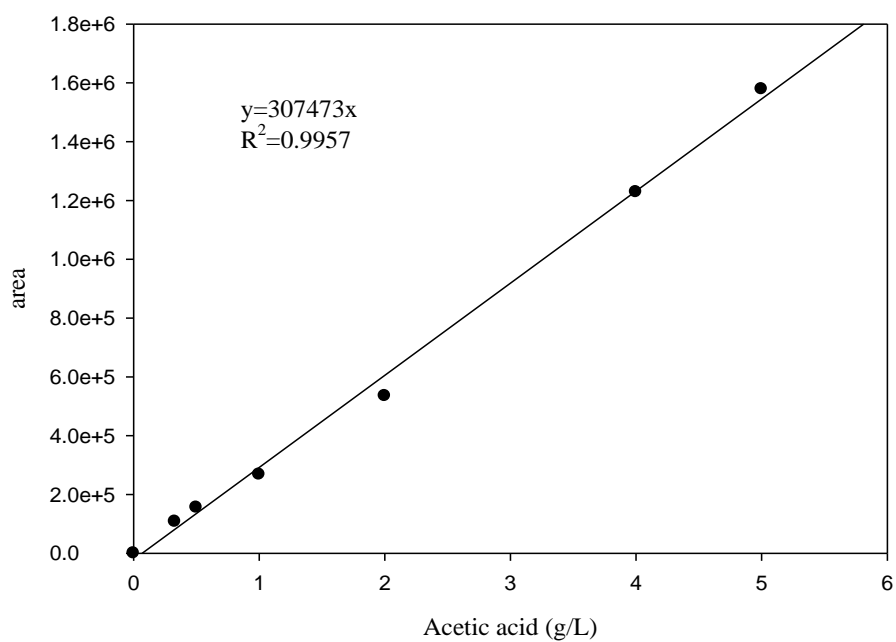
乙醇 (ethanol) 檢量線方程式: $\text{Concentration(g/l)}=\text{area}/493603$

附錄 4: 丁醇 (butanol) 檢量線



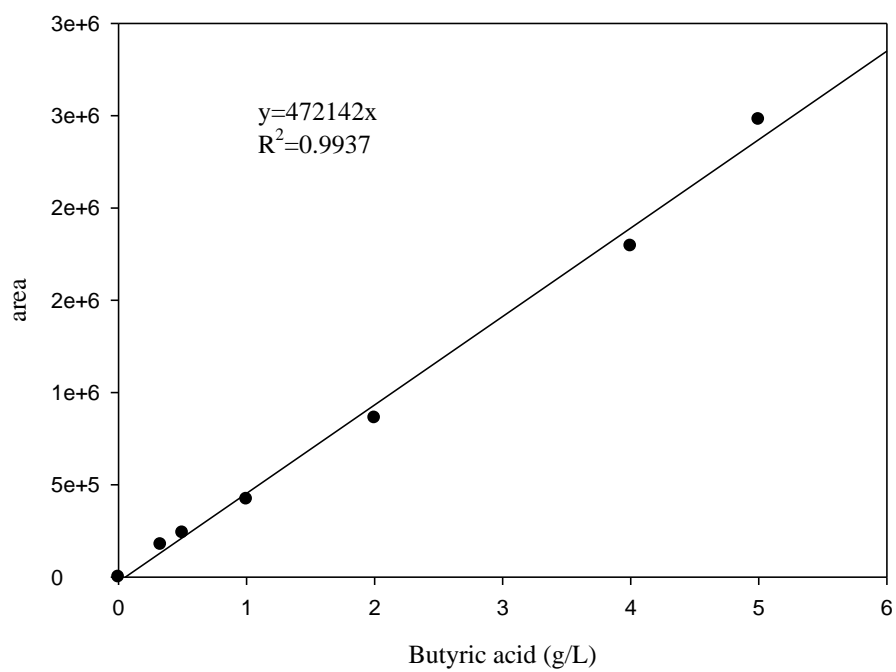
丁醇 (butanol) 檢量線方程式: $\text{Concentration(g/l)} = \text{area} / 815976$

附錄 5: 乙酸 (acetic acid) 檢量線



乙酸 (acetic acid) 檢量線方程式：Concentration(g/l)=area/307473

附錄 6: 丁酸 (butyric acid) 檢量線



丁酸 (butyric acid) 檢量線方程式：Concentration(g/l)=area/472142

簡 歷

姓名 陳志恆

籍貫 福建省金門縣

生日 77 年 9 月 10 號

學歷



教育背景	學校	系所	畢業日期
高中	金門高中	普通科	民國 95 年 6 月
大學	東海大學	化學工程學系	民國 99 年 6 月
研究所	東海大學	化學工程與材料工程所	民國 101 年 6 月

經歷

東海大學田徑代表隊

東海大學化學工程與材料工程學系助教

2011 年 生質煉油廠-替代燃料與石化品技術整合研討會

2012 年 第十七屆生化工程研討會



2010年7月實驗室成員於司馬庫斯合影